

(OPEN ACCESS)

Encapsulation of fish protein hydrolysate and fish oil by double emulsion and investigation of some of its properties

Roghayeh Jafari Taraji^{*1}, Bahareh Shabanpour², Parastoo Pourashouri³

1. Corresponding Author, Ph.D. Student of Seafood Processing, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: roghaye_j@yahoo.com
2. Professor, Dept. of Seafood Processing, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: b_shabanpour@yahoo.com
3. Associate Prof., Dept. of Seafood Processing, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: pourashouri.p@gmail.com

Article Info	ABSTRACT
Article type: Full Length Research Paper	Background and Objectives: Double emulsion is an effective technique for encapsulating bioactive compounds such as fish protein hydrolysate (FPH) and fish oil, which are sensitive to oxidation and have undesirable flavors. This study aimed to evaluate the impact of different wall materials (Whey protein Concentrate, Arabic gum, and zein) on the stability and encapsulation efficiency of these compounds using double emulsion and freeze-drying.
Article history: Received: 04.04.2024 Revised: 04.29.2024 Accepted: 04.30.2024	
Keywords: Double emulsion, Encapsulation, Fish oil, Fish protein hydrolysate, Freeze-drying	Materials and Methods: FPH was produced from <i>Carassius auratus</i> using Alcalase enzyme, and its properties were measured. Four treatments with varying wall material compositions (Whey Protein Concentrate + Arabic gum + zein, Whey Protein Concentrate + Arabic gum, Whey Protein Concentrate + zein, and Arabic gum + zein) were prepared. Double emulsion was formed via a two-step process and freeze-dried into powder. Physical properties, including creaming index, loading capacity, encapsulation efficiency, moisture, and solubility, were analyzed.
	Results: According to the results, the Whey Protein Concentrate + Arabic gum + zein treatment showed the lowest creaming index (8.33% after 21 days) and highest stability. The highest oil encapsulation efficiency (75.55%) and lowest surface oil (17.86%) were observed in the same treatment. The Arabic gum + zein treatment had the highest moisture (2.5 g/100 g) and solubility (24.44 mg/100 g). Significant differences in physical properties were noted among treatments ($P < 0.05$).
	Conclusion: The triple combination of whey protein, Arabic gum, and zein as wall materials demonstrated superior encapsulation performance and stability. This method is promising for developing functional foods with extended shelf life.

Cite this article: Jafari Taraji, Roghayeh, Shabanpour, Bahareh, Pourashouri, Parastoo. 2025. Encapsulation of fish protein hydrolysate and fish oil by double emulsion and investigation of some of its properties. *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 14 (3), 91-103.



© The Author(s).

Doi: 10.22069/japu.2024.22333.1861

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

ریزپوشانی پروتئین هیدرولیز شده و روغن ماهی با امولسیون مضاعف و ارزیابی برخی خواص آن

رقیه جعفری تراجی^{۱*}، بهاره شعبانپور^۲، پرستو پورعاشوری^۳

۱. نویسنده مسئول، دانشجوی دکتری فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: roghaye_j@yahoo.com
۲. استاد گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: b_shabanpour@yahoo.com
۳. دانشیار گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: pourashouri.p@gmail.com

چکیده	اطلاعات مقاله
نوع مقاله: سابقه و هدف: امولسیون مضاعف به عنوان یک روش مؤثر برای ریزپوشانی ترکیبات زیست‌فعال مانند پروتئین هیدرولیز شده ماهی و روغن ماهی شناخته می‌شود. این ترکیبات به دلیل خواص سلامت‌بخش، اما حساسیت به اکسیداسیون و طعم ناخوشایند، نیاز به محافظت دارند. هدف این مطالعه، بررسی تأثیر ترکیبات مختلف دیواره (کنسانتره پروتئین آب پنیر، صمغ عربی و زئین) بر پایداری و کارایی ریزپوشانی این ترکیبات با استفاده از تکنیک امولسیون مضاعف و خشک‌کن انجمادی بود. مواد و روش‌ها: پروتئین هیدرولیز شده ماهی کاراس با آنزیم آلكالاز تولید و ویژگی‌های آن اندازه‌گیری شد. چهار تیمار با ترکیبات مختلف دیواره (کنسانتره پروتئین آب پنیر + صمغ عربی + زئین، کنسانتره پروتئین آب پنیر + صمغ عربی، کنسانتره پروتئین آب پنیر + زئین، و صمغ عربی + زئین) تهیه شدند. امولسیون مضاعف به روش دومرحله‌ای تولید و با خشک‌کن انجمادی به پودر تبدیل شد. خواص فیزیکی شامل شاخص کرمی شدن، ظرفیت بارگذاری، کارایی ریزپوشانی، رطوبت و حلالیت ارزیابی گردید. یافته‌ها: از روز ۰ تا روز ۱۴ نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، اختلاف معنی‌داری در مقدار شاخص کرمی شدن مشاهده نشد ($P > 0.05$) و همه تیمارها پایدار بودند. از روز ۱۴ تا ۲۱ نگهداری، مقدار این شاخص روند افزایشی داشت. تیمار با ترکیب دیواره کنسانتره پروتئین آب پنیر + صمغ عربی + زئین کم‌ترین میزان شاخص کرمی شدن روز ۱۴ نگهداری (۳/۳۳)	تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۱/۱۶ تاریخ ویرایش: ۱۴۰۳/۰۲/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۱۱ واژه‌های کلیدی: امولسیون مضاعف، پروتئین هیدرولیز شده ماهی، خشک‌کن انجمادی، روغن ماهی، ریزپوشانی

درصد) و روز ۲۱ نگهداری (۸/۳۳ درصد) و بیش‌ترین پایداری را در طی زمان نشان داد. بررسی میزان رطوبت و حالیت پودر میکروکپسول‌های تولیدی اختلاف معنی‌داری بین تیمارها نشان داد ($P < 0/05$)، بیش‌ترین میزان رطوبت (۲/۵ گرم در ۱۰۰ گرم) و حالیت (۲۴/۴۴ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم) مربوط به تیمار با ترکیب دیواره صمغ عربی + زئین بود. بالاترین میزان کارایی ریزپوشانی روغن (۷۵/۵۵ درصد) و کم‌ترین میزان روغن سطحی (۱۷/۸۶ درصد) در تیمار با ترکیب دیواره کنسانتره پروتئین آب پنیر + صمغ عربی + زئین مشاهده شد. تیمار صمغ عربی + زئین بالاترین میزان روغن سطحی (۳۵/۲ درصد) را نشان داد که میزان روغن بیش‌تری از پودر میکروکپسول تولیدی آزاد گردید.

نتیجه‌گیری: ترکیب سه‌گانه کنسانتره پروتئین آب پنیر، صمغ عربی و زئین به‌عنوان دیواره، بهترین عملکرد را در ریزپوشانی و پایداری ترکیبات زیست‌فعال نشان داد. این روش می‌تواند برای تولید مواد غذایی فراسودمند با قابلیت نگهداری طولانی‌مدت مورد استفاده قرار گیرد.

استناد: جعفری تراچی، رقیه، شعبانپور، بهاره، پورعاشوری، پرستو (۱۴۰۴). ریزپوشانی پروتئین هیدرولیزشده و روغن ماهی با امولسیون مضاعف و ارزیابی برخی خواص آن. *نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان*، ۱۴ (۳)، ۹۱-۱۰۳.

Doi: 10.22069/japu.2024.22333.1861



© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

مقدمه

روغن‌های زیست فعال مانند اسیدهای چرب امگا ۳، نقش مهمی در تقویت سلامت و تندرستی انسان دارند. روغن ماهی منبع اصلی و عمده ایکوزاپنتانوئیک اسید (EPA) و دوکوزا هگزانوئیک اسید (DHA) در رژیم غذایی انسان می‌باشد. با وجود این مزایا بسیاری از لیپیدهای زیست فعال به سختی در غذاها گنجانده می‌شوند زیرا در طول نگهداری تجزیه و اکسید می‌شوند و دسترسی زیستی پایینی دارند (۱). پپتیدهای زیست فعال که از هیدرولیز پروتئین‌ها به دست می‌آیند می‌توانند به عنوان افزودنی غذایی در فرمولاسیون غذاهای فراسودمند به کار برده شوند. اما به دلیل رطوبت و تلخی، استفاده مستقیم از پپتیدهای زیست فعال در فرمولاسیون مواد غذایی دشوار است (۲). بنابراین، بسیار مهم است که از این ترکیبات زیست فعال در برابر تنش‌های محیطی خارجی محافظت و طعم ناخوشایند آن‌ها پوشانده شود.

یکی از راه‌های مؤثر برای استفاده از این ترکیبات زیست فعال و غلبه بر معایب ذکر شده، ریزپوشانی می‌باشد. امولسیون مضاعف^۱ آب در روغن در آب ($W_1/O/W_2$) سیستم چندفازی پیچیده‌ای است که برای ریزپوشانی مواد غذایی فعال زیستی و دارویی استفاده می‌شود. بسیاری از مقالات پژوهش‌های کاربرد مؤثر امولسیون مضاعف را برای پوشاندن بو و طعم و کنترل انتشار مواد زیست فعال در طول هضم آن‌ها را نشان داده‌اند (۳).

خشک کردن امولسیون مضاعف حاوی ترکیبات زیست فعال و تولید میکروکپسول‌های پودری، سهولت در کاربرد و ماندگاری طولانی‌تر را به همراه خواهد داشت. در حالت پودر، مواد زیست فعال در ماتریس جامد پیوسته پودر تثبیت می‌شوند، بنابراین برهمکنش ترکیبات زیست فعال محصورشده با تنش‌های خارجی

1- Multiple (double) emulsion

محدود و پایداری فیزیکی شیمیایی آن‌ها به طور قابل توجهی بهبود می‌یابد (۳).

یکی از پارامترهای مهم در افزایش کارایی ریزپوشانی و گام اصلی در ریزپوشانی ترکیبات غذایی، انتخاب ترکیب مناسب ماده دیواره است (۴). زئین^۲ پروتئین گیاهی ذرت، قابل حل در آب و الکل، به خانواده پرولامین تعلق دارد و حاوی اسیدهای آمینه آبریز نظیر پرولین، لوسین و آلانین می‌باشد. این پلیمر ایمن و به عنوان یک ترکیب سازگار با محیط زیست^۳ و زیست تخریب پذیر^۴ شناخته شده است (۵). ژانگ و همکاران (۲۰۲۲)، از ذرات کامپوزیتی زئین + صمغ عربی + تانیک اسید جهت پایداری زردچوبه استفاده کردند. نتایج نشان داد که پایداری حرارتی و فتوشیمیایی زردچوبه پس از بارگذاری در ذرات کامپوزیت بهبود یافت (۵).

کنسانتره پروتئین آب پنیر^۵ غنی از اسیدهای آمینه همانند لوسین، ایزولوسین و والین می‌باشد. از نقطه نظر کاربردی، پروتئین‌های جدا شده از آب پنیر در محدوده وسیعی از pH محلول بوده و دارای ویژگی‌هایی از جمله تشکیل ژل، امولسیفایر، تشکیل کف، حلال در نوشیدنی‌ها و مواد غذایی است. ساختار دوگانه دوست و فعال سطحی، کنسانتره پروتئین آب پنیر را قادر می‌سازد تا به راحتی در سطوح میان روغن و آب متصل شده و باعث پایداری امولسیون شود (۶). جمشیدی و همکاران (۲۰۱۸) پروتئین هیدرولیز شده ماهی^۶ و روغن ماهی را با امولسیون مضاعف ریزپوشانی کردند. بالاترین کارایی ریزپوشانی و حلالیت مربوط به ترکیب دیواره WPC + فوکوئیدان بود (۷).

2- Zein

3- Biocompatibility

4- Biodegradability

5- Whey protein concentrate (WPC)

6- Fish protein hydrolysate (FPH)

مواد و روش‌ها

روغن کبد از ماهی (*Gadus morrhua*) و ژئین از شرکت سیگما، آلمان خریداری شدند، آنزیم آلکالاز از نووازیم، دانمارک، کنسانتره کنسانتره پروتئین آب پنیر از ولاک، انگلیس، صمغ عربی از مرک، آلمان، امولسیفایر محلول در روغن PGPR از پالسگارد، دانمارک تهیه گردیدند.

تهیه پروتئین هیدرولیز شده ماهی (FPH): ماهی کاراس (*Carassius auratus*) از مزرعه پرورشی در استان گلستان تهیه شد و با یخ‌پوشی مناسب به آزمایشگاه منتقل گردید. چربی زدایی از گوشت چرخ شده ماهی طبق روش تیلانسلاکول و همکاران (۲۰۰۷) انجام گرفت (۱۰). به منظور غیرفعال‌سازی آنزیم‌های درونی، مواد خام اولیه در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری شیکردار قرار داده شدند. سپس نمونه‌ها با آب مقطر با نسبت ۱:۵ (وزنی/حجمی) رقیق شدند. بعد از تنظیم pH (۸/۵)، آنزیم آلکالاز (۲ درصد) به نمونه‌ها اضافه شد و مخلوط در بن ماری شیکردار در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه قرار داده شدند. به منظور قطع واکنش آنزیمی، نمونه‌ها در بن ماری شیکردار به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس پروتئین هیدرولیز شده، با استفاده از سانتریفیوژ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد در ۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید و مایع رویی برای بررسی‌های بعدی جمع‌آوری گردید (۱۱). بخشی از این مواد برای تعیین درجه هیدرولیز^۵ استفاده شد و بخشی دیگر برای انجام آزمایش‌های مربوطه به کمک خشک‌کن انجمادی پودر گردید و در فریزر ۲۰- نگهداری گردید.

اندازه‌گیری پروتئین محلول و درجه هیدرولیز: برای اندازه‌گیری درجه هیدرولیز، محلول ۲۰ درصد اسید

صمغ عربی^۱ پلی‌ساکاریدی بی‌رنگ از گیاه آکاسیا^۲ است. که با حلالیت بالا، ویسکوزیته کم در غلظت‌های بالا و توانایی امولسیون‌کنندگی قابل توجه، به‌طور گسترده‌ای در ریزپوشانی ترکیبات طعم‌دهنده، آنتی‌اکسیدان‌ها، روغن‌ها، پروتئین‌ها و پیتیدها استفاده می‌شود. این ماده انتخاب مناسبی برای دیواره در ریزپوشانی به‌دلیل شکل‌گیری امولسیون پایدار و محافظت از ترکیبات فرار می‌باشد (۱). هوانگ و همکاران (۲۰۲۲) از نانو ذرات ژئین و صمغ عربی به‌صورت تک‌لایه و دو لایه برای ریزپوشانی رنگدانه گیاهی روتین استفاده کردند. نتایج نشان‌دهنده کارایی بالاتر نانوذره تک‌لایه نسبت به دو لایه بود (۸). اینگ و همکاران (۲۰۲۱)، محلول پیتید سویا (۴۰ درصد وزنی/وزنی) را با موفقیت در امولسیون مضاعف W₁/O/W₂ با فرآیند دومرحله‌ای ریزپوشانی کردند. پودر میکروکپسول تولیدی با روش خشک‌کن انجمادی^۳ راندمان ریزپوشانی بالاتری (بیش از ۷۰ درصد) را در مقایسه با روش خشک کردن پاششی^۴ نشان داد (۳). هونگ و ژون (۲۰۱۸) در پژوهش خود آنتوسیانین را با تکنیک امولسیون مضاعف ریزپوشانی کردند. راندمان ریزپوشانی ۹۹/۴۵ درصد بود و رهش در معده کنترل گردید (۹).

با توجه به خواص مفید ترکیبات زیست‌فعال و امکان‌یابی استفاده از آن‌ها در فرمولاسیون غذایی، در این پژوهش ریزپوشانی پروتئین هیدرولیز شده ماهی و روغن ماهی با روش امولسیون مضاعف و ترکیب مختلف دیواره برای بالاترین کارایی ریزپوشانی مورد بررسی قرار گرفت و برخی خواص میکروکپسول‌ها ارزیابی گردید.

- 1- Arabic gum
- 2- Acacia
- 3- Freez drying
- 4- Spray drying

5- Degree of hydrolysis (DH)

تری کلرواستیک (TCA) به محلول پروتئین هیدرولیز شده اضافه گردید، سپس سانتریفیوژ برای جمع‌آوری سوپرناتانت انجام گرفت. غلظت پروتئین

$$\%DH = (10\% \text{ N محلول TCA در نمونه N در نمونه}) \times 100 \quad (1)$$

تولید میکروکپسول: امولسیون مضاعف طبق روش امولسیون‌سازی دو مرحله‌ای آماده گردید (۷، ۱۳). ابتدا امولسیون اولیه W_1/O تهیه گردید. فاز W_1 حاوی FPH (۳ درصد وزنی/وزنی) و فاز O، (روغن ماهی و امولسیفایر PGPR (۶ درصد وزنی/وزنی)) بود. قبل از شروع فرآیند امولسیون‌سازی، هر دو فاز مایع داخلی و روغنی تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد حرارت‌دهی شدند (۱۴). فاز W_1 به صورت تدریجی به فاز O (نسبت ۳۰:۷۰ وزنی/وزنی) همراه با هم‌زدن توسط هم‌زنایزر اضافه گردید. فاز W_2 با ترکیب متفاوت دیواره به صورت محلول در آب مقطر تهیه گردید (جدول ۱). امولسیون $W_1/O/W_2$ از طریق افزودن تدریجی امولسیون W_1/O به فاز W_2 (۳۰:۷۰ وزنی/وزنی) و به دنبال آن مخلوط کردن با هم‌زنایزر و بلافاصله سردسازی در حمام آبی ۴ درجه سانتی‌گراد تهیه گردید. نمونه‌های پایدار با دستگاه خشک کن انجمادی به صورت پودر در آمدند (۱۵).

جدول ۱- نسبت ترکیب مواد دیواره در فاز مایع خارجی (W_2).

Table 1. Composition ratio of wall materials in the external aqueous phase (W_2 .)

نسبت ترکیب دیواره فاز مایع خارجی (W_2) (وزنی/وزنی)			تیمار
Composition ratio of the external aqueous phase's wall (W_2) (weight/weight)			Treatment
زئین Zein	صمغ عربی Arabic gum	کنسانتره پروتئین آب پنیر Whey protein	
1	2	4	تیمار ۱ Treatment 1
-	3	4	تیمار ۲ Treatment 2
3	-	4	تیمار ۳ Treatment 3
3	4	-	تیمار ۴ Treatment 4

شاخص کرمی شدن^۱: امولسیون مضاعف تازه تهیه شده در لوله‌های آزمایش تا ارتفاع تقریباً ۶ سانتی‌متر ریخته شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. ارتفاع فاز کدر امولسیون طی ۲۱ روز اندازه‌گیری

1- Creaming index

(۲) $100 \times \text{ارتفاع اولیه امولسیون} / (\text{ارتفاع فاز پایدار امولسیون} - \text{ارتفاع اولیه امولسیون}) = \text{شاخص کرمی شدن}$

ظرفیت بارگذاری^۱ و کارایی ریزپوشانی^۲ FPH در
امولسیون اولیه: مقدار ۵ گرم امولسیون اولیه (W_1/O)
در ۵ میلی لیتر اتانول افزوده شد و در دور ۴۰۰۰rpm
به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد،
سانتریفیوژ گردید. مایع رویی (پروتئین محلول)
جمع آوری گردید و میزان پروتئین آن با روش بیورت
اندازه گیری (۱۷) و طبق رابطه زیر محاسبه گردید:

(۳) $100 \times \text{وزن امولسیون} / (\text{میزان پروتئین آزاد در امولسیون} - \text{میزان کل پروتئین موجود در امولسیون}) = LC$

(۴)

$100 \times \text{میزان کل پروتئین اولیه موجود در امولسیون} / (\text{میزان پروتئین آزاد در امولسیون} - \text{میزان کل پروتئین اولیه موجود در امولسیون}) = EE$

ارزیابی ویژگی های فیزیکی میکروکپسول های تولیدی
روغن سطحی: ۲/۵ گرم از هر میکروکپسول با ۱۵
میلی لیتر ان-هگزان در لوله فالكون مخلوط و ۲ دقیقه
ورتکس شد. لوله های فالكون حاوی نمونه ها، طی ۲۰
دقیقه در دور ۸۰۰۰rpm سانتریفیوژ شدند و پس از
آن، سوپرناتانت از روی کاغذ صافی عبور داده شد.
حلال در آن با دمای ۷۰ درجه سانتی گراد تبخیر شد.
پس از خشک شدن در آن ۱۰۵ درجه سانتی گراد،
میزان روغن سطحی طبق رابطه زیر محاسبه گردید
(۱۸):

(۵) $100 \times \text{وزن اولیه} - \text{وزن ثانویه} / \text{وزن ثانویه} = \text{روغن سطحی} (\%)$

روغن کل: از هر نمونه میکروکپسول، میزان ۵ گرم
توزین شده و در کاغذ صافی واتمن شماره ۴۲ ریخته
شد، کاغذ صافی حاوی نمونه در بالن قرار داده شد و
مقدار ۱۸۰ میلی لیتر ان-هگزان به آن اضافه گردید.
استخراج با دستگاه سوکسله طی مدت ۲ ساعت
صورت پذیرفت. سپس بالن ها از دستگاه جدا گردید
و جهت تبخیر باقی مانده حلال درون بالن ها، تا
رسیدن به وزن ثابت، در آن ۷۰ درجه سانتی گراد
گذاشته شد. با قرار گرفتن در دسیکاتور و سرد شدن،
وزن ثابت آن تعیین گردید (۱۹). تفاوت میان وزن
اولیه بالن از وزن ثانویه، چربی نمونه را نشان داد که
از رابطه زیر محاسبه شد.

(۶) $100 \times \text{وزن اولیه} - \text{وزن ثانویه} / \text{وزن ثانویه} = \text{روغن کل} (\%)$

کارایی ریزپوشانی: با توجه به مقدار روغن سطحی
و روغن کل، میزان کارایی روغن ریزپوشانی شده
طبق رابطه زیر محاسبه گردید (۲۰).

(۷) $100 \times \text{روغن سطحی} - \text{روغن کل} / \text{کارایی ریزپوشانی} (\%)$

1- Loading capacity

2- Encapsulation efficiency

مقدار رطوبت میکروکپسول‌های تولیدی: ۲ گرم از هر میکروکپسول طی ۱۶ ساعت در آون ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد تا رسیدن به وزن ثابت خشک گردید. تفاوت بین وزن اولیه و ثانویه پس از خشک شدن به‌صورت میزان رطوبت در ۱۰۰ گرم میکروکپسول گزارش گردید (۱۹).

میزان حلالیت میکروکپسول‌های تولیدی: ۰/۱ گرم از هر نمونه میکروکپسول در لوله‌های حاوی ۵ میلی‌لیتر آب مقطر به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون گردید. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۲۵۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. غلظت پروتئین محلول در فاز آبی توسط روش بیورت تعیین شد و نتایج به‌صورت میلی‌گرم بر گرم میکروکپسول بیان شدند (۲۱).

آنالیز آماری داده‌ها: تجزیه و تحلیل داده‌ها در این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی، به کمک آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) آنالیز گردید. داده‌ها به کمک نرم‌افزار آماری SPSS مورد آنالیز آماری قرار گرفتند. همه آنالیزها در سه تکرار صورت پذیرفت.

نتایج و بحث

درجه هیدرولیز: میزان پروتئین در ایزوله مینس ماهی کاراس بعد از چربی‌زدایی ۶۲/۳۷ درصد بود. درجه هیدرولیز در نمونه FPH تولیدی ۳۱/۳۹ درصد و میزان بازدهی FPH از هیدرولیز مینس ماهی ۳۱/۷۴ درصد بود. درجه هیدرولیز، نشان‌دهنده درصد باندهای شکسته شده می‌باشد. بسیاری از خواص پروتئین هیدرولیزشده از جمله میزان اسیدهای آمینه آزاد، میزان انحلال‌پذیری و وزن مولکولی پپتید تولید شده، وابسته به درجه هیدرولیز می‌باشد (۲۲).

ظرفیت بارگذاری و کارایی ریزپوشانی FPH در امولسیون اولیه: براساس نتایج حاصل از مطالعه حاضر، ظرفیت بارگذاری FPH در امولسیون اولیه

۰/۳۷ ± ۴۹/۵۹ و کارایی ریزپوشانی ۰/۶۱ ± ۸۲/۶۷ درصد بوده است. بررسی این فاکتورها به این دلیل اهمیت دارد که پایداری امولسیون اولیه بر پایداری امولسیون مضاعف تأثیرگذار است و در واقع پایداری ذرات فاز پراکنده را نشان می‌دهد. میزان سریع رهایش در ذراتی مشاهده شد که میزان بالاتری از پروتئین را در برگرفتند. به بیان دیگر میزان رهایش تحت تأثیر مقدار پروتئین به دام افتاده در امولسیون اولیه است (۱۷).

شاخص کرمی شدن: نتایج مربوط به شاخص کرمی شدن طی نگهداری در زمان در جدول ۲ نشان داده شد. از روز اول تا چهاردهم نگهداری، اختلاف معنی‌داری در مقدار این شاخص میان امولسیون‌های مضاعف دیده نشد ($P < 0.05$) و تمامی تیمارهای آزمایشی پایدار بودند. از روز ۱۴ و طی نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، مقدار شاخص کرمی شدن در تیمارها به‌طور معنی‌داری افزایش یافت و بیش‌ترین مقدار در روز ۲۱ نگهداری در تیمارهای صمغ عربی + زئین و کنسانتره پروتئین آب پنیر + زئین (۱۵ درصد) دیده شد. جمشیدی و همکاران (۲۰۱۸) اعلام کردند، ترکیب دیواره کنسانتره پروتئین آب پنیر و اینولین اثر مثبتی بر شاخص کرمی شدن و کارایی ریزپوشانی ترکیبات FPH و روغن ماهی داشت. هم‌چنین افزایش میزان کنسانتره پروتئین آب پنیر در ترکیب دیواره سبب پایداری بالاتر امولسیون مضاعف تولیدی گردید (۷). در پژوهش حاضر نیز وجود کنسانتره پروتئین آب پنیر در ترکیب دیواره تأثیر مثبتی بر پایداری داشته است. و تیمار کنسانتره پروتئین آب پنیر + صمغ عربی + زئین کم‌ترین شاخص کرمی شدن (۸/۳۳ درصد) و بیش‌ترین پایداری را طی ۲۱ روز نگهداری نشان داد. کرمی شدن نشانه اولیه عدم پایداری امولسیون‌های مضاعف بوده و منجر به دو فاز شدن امولسیون می‌گردد. یکی از عواملی که بر کارایی ریزپوشانی

روغن تأثیر داشته و سبب ثبات بهتر و کارایی بالاتر می گردد، پایداری امولسیون است که از طریق تعیین شاخص کرمی شدن مشخص می شود. امولسیون های ناپایدار توانایی اندکی در حفظ و نگهداری مواد دارند (۲۳). بالاتر بودن شاخص کرمی در تیمار صمغ عربی + زئین در کارایی ریزپوشانی روغن تأثیر داشته و این تیمار توانایی کمتری در ریزپوشانی از خود نشان داد.

جدول ۲- شاخص کرمی شدن طی نگهداری در زمان.

Table 2. Creaming index during storage time.

21	14	7	0	تیمار / زمان (روز) Treatment / Time (day)
8.33±0 ^{Ca}	3.33±0 ^{Fb}	0±0 ^{Gc}	0±0 ^{Gc}	کنسانتره پروتئین آب پنیر + صمغ عربی + زئین Whey Protein Concentrate+ Arabic gum + Zein
13.33±0 ^{Ba}	5±0 ^{Eb}	0±0 ^{Gc}	0±0 ^{Gc}	کنسانتره پروتئین آب پنیر + صمغ عربی Whey Protein Concentrate+ Arabic gum
15±0 ^{Aa}	6.66±0 ^{Db}	0±0 ^{Gc}	0±0 ^{Gc}	کنسانتره پروتئین آب پنیر + زئین Whey Protein Concentrate+ Zein
15±0 ^{Aa}	8.33±0 ^{Cb}	0±0 ^{Gc}	0±0 ^{Gc}	صمغ عربی + زئین Arabic gum + Zein

نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شده است. حروف بزرگ لاتین نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار در بین تیمارها و حروف کوچک لاتین نشان دهنده اختلاف آماری در طی زمان می باشد ($P < 0/05$)

بر سطح ذرات می باشد. بالاترین میزان روغن سطحی (۳۵/۲ درصد) و کمترین میزان کارایی ریزپوشانی (۵۵/۲۵ درصد) در تیمار صمغ عربی + زئین مشاهده گردید. که نشان دهنده عملکرد پایین تر این ترکیب دیواره می باشد. کاهش در کارایی ریزپوشانی می تواند به علت نبود مواد کافی در دیواره ها برای تولید ماتریکسی قوی، ایجاد لایه های نازک تر از مواد دیواره بین قطرات روغن کپسوله و یا بی ثباتی قطرات امولسیون طی فرایند خشک کردن باشد. بین تیمار کنسانتره پروتئین آب پنیر + صمغ عربی + زئین و کنسانتره پروتئین آب پنیر + زئین، صمغ عربی + زئین اختلاف معنی داری در کارایی ریزپوشانی دیده شد ($P < 0/05$) اما در مقایسه با کنسانتره پروتئین آب پنیر + صمغ عربی اختلاف معنی داری دیده نشد ($P > 0/05$). مطالعات پیشین نشان داده اند که نوع دیواره و هسته، ویژگی های امولسیون و پارامترهای خشک کردن بر

کارایی ریزپوشانی: میزان روغن کل، روغن سطحی و کارایی ریزپوشانی میکروکپسول های تولیدی در جدول ۳ نشان داده شد. بین تیمارهای کنسانتره پروتئین آب پنیر + صمغ عربی + زئین، کنسانتره پروتئین آب پنیر + صمغ عربی و کنسانتره پروتئین آب پنیر + زئین اختلاف معنی داری در میزان روغن کل دیده نشد ($P > 0/05$). کمترین مقدار روغن کل در تیمار کنسانتره پروتئین آب پنیر + زئین (۶۹ درصد) دیده شد. کمترین میزان روغن سطحی (۱۷/۸۶ درصد) و بیشترین میزان کارایی ریزپوشانی (۷۵/۵۵ درصد) در تیمار کنسانتره پروتئین آب پنیر + صمغ عربی + زئین مشاهده شد که نشان دهنده عملکرد بهتر سه ترکیب دیواره نسبت به سایر تیمارها می باشد. به عبارت دیگر این ترکیب دیواره سبب محافظت بیش تر روغن در ساختار میکروکپسول گردید. افزایش کارایی ریزپوشانی احتمالاً به دلیل تشکیل سریع پوسته

میزان کارایی اثرگذارند (۱۸). مطالعات مختلفی بیان کرده‌اند امولسیون‌ها که کارایی ریزپوشانی بالاتری داشته باشد، مقدار کمتری از مواد ریزپوشانی شده در سطح ذرات باقی‌مانده و پایداری بالاتری دارد

(۲۴، ۲۵). در مطالعه حاضر نیز تیمار کنسانتره پروتئین آب پنیر + صمغ عربی + زئین، پایداری بالاتر و ریزپوشانی بالاتری را از خود نشان داد.

جدول ۳- ویژگی‌های فیزیکی میکروکپسول‌ها.

Table 3. Physical properties of microcapsules.

کارایی ریزپوشانی (درصد)	روغن سطحی (درصد)	روغن کل (درصد)	تیمار
Encapsulation efficiency (%)	Surface oil (%)	Total oil (%)	Treatment
75.55 ^a ± 9.002	17.86 ^c ± 7.43	72.33 ^{ab} ± 3.21	کنسانتره پروتئین آب پنیر + صمغ عربی + زئین Whey Protein Concentrate+ Arabic gum + Zein
74.03 ^{ab} ± 3.23	20 ^{bc} ± 2.62	77.00 ^a ± 1	کنسانتره پروتئین آب پنیر + صمغ عربی Whey Protein Concentrate+ Arabic gum
63.45 ^{cd} ± 3.45	25.2 ^b ± 2.22	69 ^{bc} ± 1.73	کنسانتره پروتئین آب پنیر + زئین Whey Protein Concentrate+ Zein
55.25 ^d ± 7.5	35.2 ^a ± 3.41	79.33 ^a ± 7.02	صمغ عربی + زئین Arabic gum + Zein

نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده است. حروف متفاوت لاتین در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در بین تیمارها می‌باشد (P<۰/۰۵)

کم‌ترین مقدار در تیمار کنسانتره پروتئین آب پنیر + صمغ عربی + زئین (۱۴/۲۸) مشاهده گردید. حلالیت میکروکپسول‌ها در آب ناشی از ایجاد پل‌های ارتباطی میان ترکیبات آن‌ها و قطرات آب است که منجر به افزایش اتصال پل‌های ارتباطی ایجاد شده و قوی‌تر شدن اتصال و ارتباط میان آن‌ها می‌گردد. بوفو و همکاران (۲۰۰۲)، در مطالعه خود بیان کردند حضور مقادیر بالای آب و رطوبت در میکروکپسول‌ها منجر به تجمع ذرات می‌شود که در نتیجه آن نفوذ مایع به درون ذرات راحت‌تر شده و حلالیت افزایش می‌یابد (۲۷). نتیجه مشابهی در مطالعه حاضر در میکروکپسول تولیدی صمغ عربی + زئین دیده شد که بیش‌ترین مقدار رطوبت را نشان داده و در نتیجه بالاترین حلالیت را داشته است.

رطوبت و حلالیت: طبق جدول ۴ میزان رطوبت در میکروکپسول‌های حاصل از خشک‌کن انجمادی بین ۲/۵ تا ۰/۵ گرم در ۱۰۰ گرم بود. میزان رطوبت بین تیمارهای مورد بررسی اختلاف معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵). بیش‌ترین میزان در تیمار صمغ عربی + زئین (۲/۵) و کم‌ترین مقدار در کنسانتره پروتئین آب پنیر + صمغ عربی + زئین (۰/۵) دیده شد. کلایپرادیث و هووانگ (۲۰۰۸)، اعلام کردند که مواد خشک در رطوبت ۱۰-۳ گرم در ۱۰۰ گرم، بهترین حالت پایداری را دارند (۲۶).

بررسی حلالیت اختلاف معنی‌داری را در بین ۴ تیمار مورد بررسی نشان داد (P<۰/۰۵). تمامی میکروکپسول‌ها در آب قابل حل بودند. بیش‌ترین میزان حلالیت در تیمار صمغ عربی + زئین (۲۴/۴۴) و

جدول ۴- رطوبت و حلالیت در میکروکپسول‌های تولیدی.

Table 4. Moisture and solubility of the produced microcapsules.

تیما	رطوبت (گرم/۱۰۰ گرم)	حلالیت (میلی گرم/۱۰۰ گرم)
Treatment	Moisture (g/100g)	Solubility (mg/100g)
کنسانتره پروتئین آب پنیر + صمغ عربی + زئین Whey Protein Concentrate+ Arabic gum + Zein	0.5 ^d ± 0	14.28 ^d ± 0.21
کنسانتره پروتئین آب پنیر + صمغ عربی Whey Protein Concentrate+ Arabic gum	1 ^c ± 0	17.47 ^c ± 0.11
کنسانتره پروتئین آب پنیر + زئین Whey Protein Concentrate+ Zein	1.33 ^b ± 0.28	20.08 ^b ± 0.11
صمغ عربی + زئین Arabic gum + Zein	2.5 ^a ± 0	24.44 ^a ± 0.22

نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده است. حروف متفاوت لاتین در هر ستون نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار در بین تیمارها می باشد (P<۰/۰۵)

نتیجه گیری کلی

هدف از مطالعه حاضر، ریزپوشانی پروتئین هیدرولیز شده و روغن ماهی با روش امولسیون مضاعف W1/O/W2 در دیواره‌هایی با ترکیب مختلف از کنسانتره پروتئین آب پنیر، صمغ عربی و زئین، بررسی برخی خصوصیات و انتخاب بهترین ترکیب برای ریزپوشانی بود. نتایج نشان داد که تیمار با ترکیب دیواره کنسانتره پروتئین آب پنیر + صمغ عربی + زئین نسبت به سایر تیمارها پایداری بیش تر در طی زمان داشت و از نظر خواص فیزیکی کارایی ریزپوشانی بالاتر و میزان روغن سطحی کمتری نسبت به سایر تیمارها از خود نشان داد. در مجموع، ریزپوشانی روش مناسبی برای استفاده از ترکیبات زیست فعال دریایی می باشد.

داده‌ها و اطلاعات

این پژوهش براساس داده‌ها و اندازه‌گیری‌های آزمایشگاهی رساله دکتری نویسنده اول نگارش شده است. آزمایش‌ها و اندازه‌گیری‌ها در آزمایشگاه‌های

فرآوری، ژنتیک و مرکزی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام پذیرفت.

مشارکت نویسندگان

نویسنده اول: انجام آزمایش‌ها، اندازه‌گیری‌ها، آنالیز داده‌ها، تحلیل داده‌ها و نگارش مقاله.
نویسنده دوم: طرح تحقیق و نظارت و بازبینی نهایی مقاله.
نویسنده سوم: مشارکت در روش‌شناسی پژوهش و آنالیزها.

اصول اخلاقی

نویسندگان اصول اخلاقی را در انجام و انتشار این اثر رعایت نموده اند و این موضوع مورد تأیید همه نویسندگان است.

تعارض منافع

در این مقاله تعارض منافی وجود ندارد و این مسأله مورد تأیید همه نویسندگان است.

منابع

- McClements, D. J., & Öztürk, B. (2021). Utilization of Nanotechnology to Improve the Handling, Storage and Biocompatibility of Bioactive Lipids in Food Applications. *Foods*, 10(2), 365. <https://doi.org/10.3390/foods10020365>.
- Sarabandi, K., Gharehbaglou, P., & Jafari, S. M. (2020). Spray-drying encapsulation of protein hydrolysates and bioactive peptides: Opportunities and challenges. *Drying Technology*, 38(5-6), 577-595.
- Ying, X., Gao, J., Lu, J., Ma, C., Lv, J., Adhikari, B., & Wang, B. (2021). Preparation and drying of water-in-oil-in-water (W/O/W) double emulsion to encapsulate soy peptides. *Food Research International*, 141, 110-148.
- Pourashouri, P., Shabanpour, B., Razavi, S.H., Jafari, S. M., Shabani, A., & Aubourg, S. (2014). Impact of Wall Materials on Physicochemical Properties of Microencapsulated Fish Oil by Spray Drying. *Journal of Food Bioprocess Technology*, 51(8), 348-355.
- Zhang, Y., Liu, G., Ren, F., Liu, N., Tong, Y., Li, Y., & Wang, P. (2022). Delivery of curcumin using Zein-Arabic gum-Tannic Acid composite particles: Fabrication, characterization, and in vitro release properties. *Frontiers in Nutrition*, 9, 842-850.
- Lam, R. S., & Nickerson, M. T. (2015). The effect of pH and temperature pre-treatments on the physicochemical and emulsifying properties of Whey Protein Concentrate isolate. *LWT-Food Science and Technology*, 60, 427-434.
- Jamshidi, A., Shabanpour, B., Pourashouri, P., & Raeisi, M. (2018). Using WPC-inulin-fucoidan complexes for encapsulation of fish protein hydrolysate and fish oil in W1/O/W2 emulsion: Characterization and nutritional quality. *Journal of Food Research International*, 114, 240-250.
- Huang, X., Ge, X., & Wang Y. (2022). Single-layer and double-layer zein-Arabic gum nanoencapsulations: Preparation, structural characterization, thermal properties and controlled release in the gastrointestinal tract. *Food Engineering, Materials Science, & Nanotechnology*, 87(10), 4580-4595. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16316>.
- Huang, Y., & Zhou, W. (2018). Microencapsulation of anthocyanins through two-step emulsification and release characteristics during in vitro digestion. *Food Chemistry*, 278(4). doi: <https://doi.org/10.1016/j.11.073>.
- Thiansilakul, Y., Benjakul, S., & Shahidi, F. (2007). Compositions, functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from round scad (*Decapterus maruadsi*). *Food Chemistry*, 103(4), 1385-1394.
- Ovissipour, M., Rasco, B., Shiroodi, S. G., Modanlow, M., Gholami, S., & Nemati, M. (2012). Antioxidant activity of protein hydrolysates from whole anchovy sprat (*Clupeonella engrauliformis*) prepared using endogenous enzymes and commercial proteases. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(7), 1718-1726.
- Jayaprakash, R., & Perera, C. O. (2020). Partial Purification and Characterization of Bioactive Peptides from Cooked New Zealand Green-Lipped Mussel (*Perna canaliculus*) Protein Hydrolyzates. *Foods*, 9(7), 879. <https://doi.org/10.3390/foods9070879>.
- Benichou, A., Aserin, A., & Garti, N. (2007). W/O/W double emulsions stabilized with WPI-polysaccharide complexes. *Journal of Colloids and Surfaces*, 294, 20-32.
- Poyato, C., Navarro-Blasco, I., Valvo, M. I., Caverio, R. Y., Astiasaran, I., & Ansorena, D. (2013). Oxidative stability of O/W and W/O/W emulsions: Effect of lipid composition and antioxidant polarity. *Journal of Food Research International*, 51, 132-140.
- Anwar, S. H., & Kunz, B. (2011). The influence of drying methods on the

- stabilization of fish oil microcapsules: Comparison of spray granulation, spray drying, and freeze drying. *Journal of Food Engineering*, 105, 367-378.
16. Sapei, L., Naqavi, M. A., & Rousseau, D. (2012). Stability and release properties of double emulsions from food applications. *Journal of Food Hydrocolloids*, 27, 316-323.
17. Xu, Y., & Du, Y. (2003). Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 250, 215-226.
18. Klinkesorn, U., Sophanodora, P., Chinachoti, P., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2006). Characterization of spray-dried tuna oil emulsified in two-layered interfacial membranes prepared using electrostatic layer-by-layer deposition. *Food Research International*, 39(4), 449-457.
19. AOAC. (2002). Official Methods of Analysis. Cunnif, (Ed.), Gaithersburg, MD, pp. 3.
20. Tan, C., Xue, J., Abbas, S., Feng, B., Zhang, X., & Xia, S. (2014). Liposome as a delivery system for carotenoids: comparative antioxidant activity of carotenoids as measured by ferric reducing antioxidant power, DPPH assay and lipid peroxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(28), 6726-6735.
21. Gan, C. Y., Cheng, L. H., & Easa, A. M. (2008). Evaluation of microbial transglutaminase and ribose cross-linked soy protein isolate-based microcapsules containing fish oil. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(4), 563-569.
22. Šlizyte, R., Dauksas, E., Falch, E., Storrø, I. & Rustad, T. (2005). Yield and composition of different fractions obtained after enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products. *Process Biochemistry*, 40, 1415-1424.
23. Dickinson, E., (2011). Double emulsions stabilized by food biopolymers. *Journal of Food Biophysics*, 6 (1), 1-11.
24. Barbosa, M. I. M. J., Borsarelli, C. D., & Mercadante, A. Z. (2005). Light stability of spray-dried bixin encapsulated with different edible polysaccharide preparations. *Food Research International*, 38, (8-9), 989-994.
25. Carneiro, H. C., Tonon, R. V., Grosso, C. R., & Hubinger, M. 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(4), 443-451.
26. Klaypradit, W., & Huang, Y. W. (2008). Fish oil encapsulation with chitosan using ultrasonic atomizer. *LWT-Food Science and Technology*, 41, 1133-1139.
27. Buffo, R. A., Probst, K., Zehentbauer, G., Luo, Z., & Reineccius, G. A. (2002). Effect of agglomeration on the properties of spray-dried encapsulated flavors. *Flavour and Fragrance Journal*, 17, 292-299.

