

## بهینه سازی نانوریزپوشانی اسید فولیک به کمک روش تاگوچی

الهام اسدپور<sup>۱</sup>، یحیی مقصودلو<sup>۲</sup>، سید مهدی جعفری<sup>۳\*</sup>، محمد قربانی<sup>۴</sup>، مهران اعلمی<sup>۵</sup>

۱- استادیار، گروه صنایع غذایی، موسسه آموزش عالی غیر انتفاعی بهاران، ایران.

۲- استاد گروه صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران.

۳- دانشیار گروه مهندسی مواد و طراحی صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران.

۴- دانشیار گروه صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران.

۵- دانشیار گروه صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران.

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

### چکیده

به دلیل حساسیت اسید فولیک همانند بسیاری از ویتامین‌های دیگر به شرایط محیطی و عملیات فرآوری، ضروری است که توسط روش‌هایی با کارایی بالا نظیر میکرو/نانوانکپسولاسیون از این ویتامین محافظت شود. هدف پژوهش حاضر، پیدا کردن شرایط بهینه تولید امولسیون‌های دوگانه پکتین-کنسانتره پروتئین آب پنیر (WPC<sup>۱</sup>) برای نانوانکپسوله کردن اسیدفولیک از طریق فرآیند خشک کردن پاششی بود. برای این منظور، ۵ متغیر مستقل همراه با محدوده عملیاتی آنها شامل غلظت پکتین، غلظت WPC، میزان فاز پراکنده، pH و نوع سامانه سورفکتانت به‌عنوان متغیرهای تیمار و راندمان انکپسولاسیون (EE<sup>۲</sup>) به‌عنوان متغیر پاسخ اصلی انتخاب شدند. طرح‌ریزی آزمایش‌ها در این مرحله به کمک روش تاگوچی صورت گرفته و ۱۶ تیمار تعیین گردید. امولسیون‌های دوگانه نهایی، فرمولاسیون‌هایی بودند که حاوی یک نانو/میکروامولسیون داخلی متشکل از سامانه آب (دارای اسیدفولیک محلول) در روغن و یک فاز آبی بیرونی متشکل از کمپلکس بیوپلیمری پکتین-WPC بودند. میانگین کلی راندمان انکپسولاسیون اسیدفولیک در این سامانه حدود ۸۸/۳ درصد در محدوده ۸۲/۳ تا ۹۵/۰ درصد بدست آمد. آنالیز اثرات اصلی با روش تاگوچی نشان داد که میزان فاز پراکنده امولسیون-های دوگانه، مهمترین تیمار اثرگذار بر EE بوده (۳۶٪) و سامانه سورفکتانت دارای کمترین تاثیر (۵٪) بود. همچنین، نتایج این مرحله مشخص نمود که مهمترین برهم‌کنش بین متغیرهای مستقل با توجه به اثرگذاری بر EE، مربوط به اثر متقابل بین WPC و میزان فاز پراکنده می‌باشد درحالی‌که اثر متقابل پکتین-pH دارای کمترین تاثیر بود. در مجموع، شرایط بهینه عبارت بود از غلظت پکتین ۱٪، غلظت WPC ۴٪، میزان فاز پراکنده ۱۵٪، pH برابر ۶ و سامانه سورفکتانت PGPR<sup>۳</sup> با نانوامولسیون داخلی که قادر است راندمان انکپسولاسیون اسید فولیک را به ۹۹٪ برساند.

**کلیدواژگان:** اسید فولیک، نانوانکپسولاسیون، بهینه‌سازی، خشک کردن پاششی، امولسیون دوگانه.

\* مسئول مکاتبات: smjafari@gau.ac.ir

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

## ۱- مقدمه

پژوهش‌های انجام شده در سال‌های اخیر نشان داده است که رژیم‌های حاوی غلظت‌های پایین یا ناکافی فولات ممکن است منجر به بروز برخی ناهنجاری‌ها و اختلالات عملکردی در انسان شود. در بسیاری از کشورها، بویژه کشورهای در حال توسعه، مردم از کمبود مصرف فولات‌ها رنج می‌برند و جذب فولات کمتر از مقدار توصیه شده است. لذا غنی‌سازی محصولات غذایی با اسید فولیک به صورت اجباری انجام می‌شود. برای غنی‌سازی مواد غذایی، آرد غلات یکی از گزینه‌های اصلی می باشد چراکه توسط عمده مردم مصرف می شوند. برای مثال مقدار غنی سازی در ایالات متحده آمریکا  $140 \mu\text{g}$  و در انگلستان  $240 \mu\text{g}$  اسید فولیک به ازای هر  $100 \text{gr}$  آرد می باشد [۱]. در کشور ما نیز در سال‌های اخیر غنی سازی آرد با اسید فولیک به صورت اجباری انجام می شود که البته این روش با مشکلاتی همراه است. اسید فولیک به خاطر دارابودن ویژگی‌های ویتامینی و سلامتی‌بخش، باید در مقابل شرایط نامساعد محیطی، مورد محافظت قرار گرفته و میزان رهایش آن پیش گردد زیرا اسید فولیک و فولات‌ها به شرایط عملیاتی و فرآوری و همچنین شرایط نگهداری بسیار حساس می باشند و از بین می روند. به همین منظور، در این پژوهش برای افزایش پایداری این ترکیبات، فناوری نانوریزپوشانی ارائه شده است که روشی مؤثر در حفظ ترکیبات حساس در مقابل فرآوری می باشد.

رایج ترین روش آزادسازی کنترل شده در صنعت غذا میکروانکپسولاسیون<sup>۱</sup> یا ریزپوشانی نام دارد که عبارت است از به دام افتادن یک ماده در ماده‌ی دیگر که منجر به تولید ذراتی با قطر چند نانومتر تا چند میکرومتر می گردد. ماده محصور شده تحت عنوان هسته<sup>۲</sup>، عامل فعال<sup>۳</sup>، یا فاز داخلی<sup>۴</sup>، و ماده احاطه کننده تحت عنوان ماده دیواره<sup>۵</sup>، پوشش<sup>۶</sup>، و یا فاز خارجی<sup>۷</sup> نامیده می شود.

انتخاب روش انکپسولاسیون و مواد مورد استفاده بستگی به کاربرد محصول انکپسوله شده شامل رهایش ترکیبات هسته‌ای دارد. امولسیفیکاسیون و مواد امولسیفیکه کننده نقش مهمی را در

ریزپوشانی ایفا می کنند. بر اساس مطالعات انجام شده، قطرات کوچکتر روغن با ثبات بیشتری در محصول ریزپوشانی شده باقی می ماندند و میکروکپسول‌های تولید شده با امولسیون با قطرات کوچک دارای روغن بدون پوشش کمتری هستند [۲]. بسیاری از خصوصیات امولسیون‌ها از قبیل پایداری، رئولوژی، ظاهر، حفظ طعم، رنگ و بافت به قطر متوسط و توزیع اندازه قطرات بستگی دارد [۳ و ۴]. به عنوان مثال هر چه اندازه قطرات کوچک تر باشد، ظاهر امولسیون از سفید به شفاف میل می کند و در عین حال پایداری امولسیون نیز افزایش می یابد [۳]. از این رو واضح است که کنترل دقیق اندازه قطرات در امولسیون‌های تهیه شده برای کاربردهای مختلف اهمیت بسیار زیادی دارد.

بر اساس اندازه قطرات نیز امولسیون‌ها را می توان به انواع میکروامولسیون<sup>۸</sup> ( $100-10 \text{nm}$ )، مینی یا نانوامولسیون<sup>۹</sup> ( $1000-100 \text{nm}$ ) و ماکروامولسیون<sup>۱۰</sup> ( $1000-10 \mu\text{m}$ ) تقسیم کرد [۵]. کاربرد نانوامولسیون‌ها به عنوان سامانه‌های رسانش نوین ترکیبات زیست فعال در صنایع غذایی و دارویی روزه روز در حال گسترش است. نانوامولسیون‌های واقعی، سامانه‌هایی هستند که حاوی قطراتی با اندازه کمتر از  $100$  نانومتر در فاز پراکنده خود هستند و موسوم به میکروامولسیون‌ها می باشند [۳]. فواید بالقوه میکروامولسیون‌ها عبارت است از شفافیت ظاهری، پایداری بالا در مقابل دوفاز شدن، به هم چسبیدن قطرات و ملحق شدن آنها، جذب بالا و زیست دسترسی مناسب به ترکیبات زیست فعال و فراسودمند. میکروامولسیون یک سامانه پایدار از نظر ترمودینامیکی است که به صورت خودبه خودی تشکیل شده و دارای ظاهری کاملاً شفاف است.

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

1. Microencapsulation
2. Core material
3. Active agent
4. Internal phase
5. Wall material
6. Coating
7. External phase

8. Microemulsion
9. Nanoemulsion
10. Macroemulsion

فعال مختلف از انواع بیوپلیمرها استفاده شده است اما پژوهش خاصی در مورد طراحی سامانه نانوحامل کمپلکسی که قادر به رهایش کنترل شده اسید فولیک از امولسیون‌های دوگانه W/O/W باشد، گزارش نشده است. در این پژوهش، هدف اصلی تولید یک نانوحامل جدید برای اسید فولیک از طریق تهیه امولسیون‌های چندگانه W/O/W و پایدارشده با بیوپلیمرهای پروتئینی-پلی ساکاریدی (پروتئین آب پنیر-پکتین) است. از آنجایی که پارامترهای مختلفی بر تشکیل کمپلکس بیوپلیمری و امولسیون‌سازی نهایی اثرگذار هستند مانند نسبت بیوپلیمرهای به کاررفته، pH محیط، غلظت هریک از بیوپلیمرها، مقدار ترکیب زیست‌فعال، درصد حجمی فاز پراکنده امولسیون، نوع سورفکتانت و غیره، لذا ضروری است مهمترین فاکتورها انتخاب شده و دانش و اطلاعات کافی در زمینه برهمکنش بین این فاکتورها نیز وجود داشته باشد و در نهایت اینکه، فرآیند مذکور بهینه شود. روش تاگوچی می تواند روشی کارآمد برای این منظور باشد طوری که به کمک آن می توان حداقل تعداد تیمارهای آزمایشی را با حداکثر تعداد متغیرهای مستقل طرح‌ریزی نمود. با هدف بهبود راندمان انکسولاسیون اسید فولیک در فرمولاسیون‌های امولسیونی W/O/W و با به‌کارگیری کمپلکس پکتین-پروتئین آب پنیر در فاز بیرونی آنها، برای اولین بار از روش تاگوچی در این پژوهش استفاده می‌شود.

## ۲- مواد و روش ها

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

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

امولسیون، دو لایه بین‌سطحی متفاوت وجود دارد یکی لایه بین سطحی W<sub>1</sub>-O در اطراف قطرات آب داخلی و دیگری، لایه بین سطحی O-W<sub>2</sub> در اطراف قطرات روغن. متعاقب آن، معمولاً دو نوع امولسیفایر متفاوت برای پایدارسازی امولسیون W<sub>1</sub>/O/W<sub>2</sub> نیاز است: یک امولسیفایر محلول در روغن برای قطرات آب داخلی و یک امولسیفایر محلول در آب برای قطرات روغن. به دلیل افزایش سطح تماس، امولسیون‌های دوگانه نسبت به امولسیون‌های ساده و معمولی دارای پایداری ترمودینامیکی پایین‌تری هستند. در مجموع، امولسیون‌های دوگانه در برابر شرایط فرآوری حساس بوده و امکان تخریب آنها مثلاً از طریق مهاجرت آب بین فازهای آبی داخلی و بیرونی وجود دارد که در این صورت، تبدیل به امولسیون‌های ساده و تک‌گانه خواهند شد [۶ و ۷].

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

باتوجه به مطالب گفته‌شده می‌توان گفت که ریزپوشانی، روشی کارآمد در حفظ اسید فولیک و مشتقات آن در شرایط مختلف فرآوری بوده است. البته در هیچ روش مورد مطالعه از امولسیون دوگانه و نانوامولسیون استفاده نشده است و با توجه به فواید این روش می‌توان پایداری این ماده حساس در شرایط محیطی و در عین حال، ضروری از نظر تغذیه‌ای را با حداکثر کارایی انجام داد و با پیاده‌سازی شرایط مختلف در سیستم مدل، امکان استفاده از آن درغنی سازی محصولات غذایی را فراهم نمود. اگرچه برای ریزپوشانی ترکیبات زیست

گردید. برای تغییر pH محلول با توجه به مقادیر تعیین شده در جدول ۱ از HCL ۰/۱ نرمال و بافر فسفات استفاده شد [۱۰]. تهیه محلول مالتو دکسترین: ابتدا پودر مالتو دکسترین به آب اضافه شده و بعد از هم زده شدن، به مدت یک شب در دمای اتاق نگهداری گردید تا به صورت کامل حل شود [۱۱]. ضمناً به تمامی محلول‌ها، سدیم آزاید به عنوان ترکیب ضد میکروبی با غلظت ۰/۰۲ درصد اضافه گردید.

### ۲-۲- تهیه امولسیون دوگانه W/O/W

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

### ۲-۳- تولید پودرهای حاوی اسید فولیک

#### ریزپوشانی شده توسط خشک‌کن پاششی

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

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

### ۲-۱- تهیه محلول بیوپلیمرها

محلول پروتئین آب پنیر: ابتدا پودر پروتئین آب پنیر به آب اضافه گردیده و بعد از هم زدن به مدت یک شب در داخل یخچال نگهداری شد. سپس pH محلول با استفاده از بافر فسفات روی ۷ تنظیم شده و به مدت ۲۰ دقیقه در داخل حمام آب ۷۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت تا ساختار پروتئینی جهت کارایی بالا باز شود. غلظت‌های وزنی-وزنی تهیه شده برای محلول پروتئین آب پنیر عبارت بودند از ۴، ۶، ۸ و ۱۰ درصد (جدول ۱).

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

محلول کمپلکس پروتئین آب پنیر و پکتین: برای این کار، ابتدا محلول پروتئین آب پنیر و محلول پکتین مطابق توضیحات فوق به صورت جداگانه تهیه شده و سپس این دو محلول، باهم مخلوط شده و به مدت ۲ ساعت با هات پلیت استایر هم زده شده و به مدت یک شب در دمای اتاق نگهداری

Table 1 Design factors of Taguchi experiment applied in this study

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

<sup>a</sup> Internal phase was composed of micro-emulsions (with a droplet size of less than 100 nm)

<sup>b</sup> Internal phase was a nano-emulsion (100-1000 nm).

1. Dispersed Phase Volume Fraction

به دست آمده در بخش ۲-۴ می‌باشد. به منظور تعیین میزان اسیدفولیک کل، مقدار ۱۰۰ میلی گرم پودر، وزن شده و در ۷ میلی لیتر هگزان و ۳ میلی لیتر بافر فسفات (pH=9.5) حل شد. سپس به منظور تخریب غشای نانوکپسول‌ها، نمونه‌ها توسط به مدت ۵ دقیقه تحت تاثیر امواج اولتراسوند با شدت قرار گرفته و در دور ۳۵۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. در ادامه فاز سوپرناتانت استخراج شده و پس از رقیق سازی نمونه‌ها به اندازه کافی، میزان اسید فولیک مطابق بخش قبلی با استفاده از روش اسپکتروفتومتری تعیین شد. در نهایت، راندمان ریزپوشانی بر اساس معادله ۱ محاسبه شد [۱۴].

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

### ۲-۶- روش های آماری

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

### ۳- نتایج و بحث

#### ۳-۱- تعیین فاکتورهای مهم و سطوح آنها

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

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

#### ۲-۴- اندازه گیری میزان اسیدفولیک سطحی<sup>۱</sup>

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

#### ۲-۵- تعیین راندمان ریزپوشانی

میزان حفظ اسیدفولیک پس از ریزپوشانی با راندمان و به صورت معادله ۱ گزارش می‌شود که در این معادله EE راندمان ریزپوشانی، TFA میزان اسیدفولیک کل نمونه‌های پودر پس از ریزپوشانی و SFA میزان اسیدفولیک سطحی

1. Surface content

شکل‌های ترکیبی ممکن، طرح‌ریزی تاگوچی در مرحله طراحی آزمایشات به‌کارگرفته شد تا بادر نظر گرفتن محدوده تعریف‌شده متغیرها، بتوان فرمولاسیون بهینه‌ای حاوی اسیدفولیک با بیشترین راندمان انکپسولاسیون تولید نمود.

در هر زمان یک فاکتور باید تغییر یابد که باعث افزایش بیش از حد تعداد تیمارها و در نتیجه، هدر رفتن مواد مصرفی و طولانی شدن زمان انجام آزمایشات می‌گردد. بنابراین، برای به- حد اقل رساندن تعداد تیمارها و مطالعه تاثیر فاکتورها در تمام

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

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

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

### ۳-۳- تاثیر اصلی متغیرهای مستقل بر راندمان

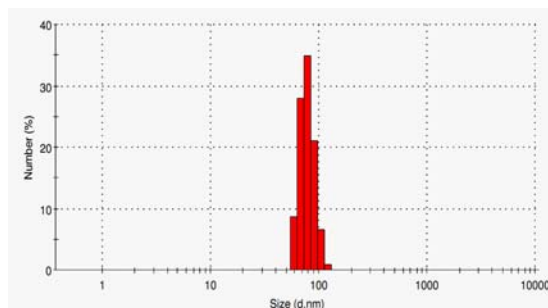
#### انکپسولاسیون اسید فولیک

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

### ۳-۲- نتایج اندازه قطرات امولسیون های

#### دوگانه

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



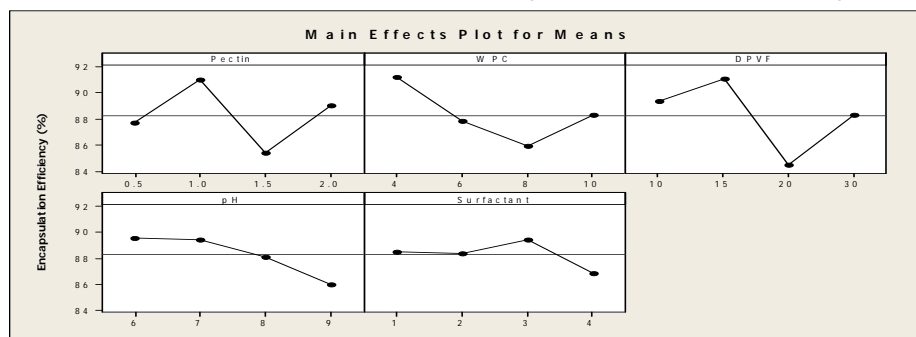
**Fig 1** Droplet size analysis results of double emulsions containing folic acid by Dynamic Light Scattering (DLS) technique for the formulation No. 1: 0.5% pectin; 4.0% WPC; 10% dispersed phase volume fraction of Span based nano-emulsion containing folic acid with a pH= 6.

1. Dynamic Light Scattering

ساکاریدهای نظیر پکتین، بار منفی عمدتاً ناشی از حضور گروه‌های کربوکسیل بوده و درمورد پروتئین‌ها، بار مثبت معمولاً در pHهای اسیدی و پایین تر از نقطه ایزوالکتریک آنها وجود خواهد داشت [۱۷ و ۱۸]. نتایج ما (شکل ۲) نشان داد که غلظت فاز پراکنده یعنی میزان نانوامولسیون آب در روغن اسید فولیک بعنوان فاز داخلی امولسیون دوگانه و همچنین، غلظت بیوپلیمرهای بکاررفته در فاز آبی بیرونی امولسیون‌های دوگانه تأثیر قابل توجهی بر راندمان انکپسولاسیون اسید فولیک در فرمولاسیون‌های تولیدی داشت.

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

یک شرط مهم برای تشکیل کمپلکس‌های الکترواستاتیک، طبیعتاً وجود بارهای الکتریکی مختلف بر روی ترکیبات واکنش‌دهنده می باشد. به‌طور معمول این فرآیند از طریق به-کارگیری یک پلی ساکارید آنیونی (مثلاً پکتین) در ترکیب با یک پروتئین (کنسانتره پروتئین آب پنیر در پژوهش حاضر) صورت می‌گیرد که دارای بار مثبت در pH کمتر از نقطه ایزوالکتریک خود می‌باشد [۱۵ و ۱۶]. درمورد پلی-



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

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

کاهش راندمان انکپسولاسیون می‌گردد. لوتز و همکاران نیز در سال ۲۰۰۹ [۱۹] با مطالعه بر روی امولسیون‌های دوگانه تولید شده از ایزوله پروتئین آب پنیر-پکتین دریافتند که نسبت وزنی ۴ به ۰/۵ (پکتین) از این دو بیوپلیمر باعث تولید امولسیون-هایی با کوچکترین اندازه قطرات و بیشترین پایداری گردید. شاید اختلاف بین نسبت بهینه این پژوهشگران با نسبت بهینه-ای که در پژوهش حاضر به دست آمده است مربوط به اختلاف در درجه خلوص بیوپلیمرهای پروتئین (کنسانتره پروتئین آب پنیر در مقایسه با ایزوله آن) و پکتین (دارای متوکسیل کم در مقایسه با پکتین اصلاح شده) مصرفی و در نتیجه، وجود اختلاف در داده‌های رئولوژیکی/فیزیکوشیمیایی بین نمونه‌های این دو پژوهش باشد.

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

همانطور که در شکل ۲ مشاهده می شود، بیشترین راندمان انکپسولاسیون اسید فولیک زمانی به دست آمده است که غلظت پکتین و کنسانتره پروتئین آب پنیر به ترتیب برابر ۱ و ۴ درصد وزنی بوده است. به عبارت دیگر، یک نسبت وزنی ۱ به ۴ از پکتین: پروتئین آب پنیر منجر به تولید نمونه‌ای با بالاترین راندمان انکپسولاسیون شده است. این نتایج نشان می‌دهد که امولسیون‌های دوگانه تولیدی با ۱ درصد پکتین و ۴ درصد پروتئین آب پنیر دارای پایداری مناسبی بوده و رهائش کمی از اسید فولیک از نانوامولسیون‌های فاز داخلی به فاز آبی بیرونی در امولسیون‌های دوگانه رخ داده است که در نتیجه، بیشترین راندمان انکپسولاسیون را به همراه داشته است. در نسبت‌های کمتر یا بیشتر پکتین: پروتئین آب پنیر، تشکیل کمپلکس بین این دو بیوپلیمر با بار مخالف دارای استحکام و قدرت کافی برای حفاظت از اسید فولیک انکپسوله‌شده در فاز داخلی نبوده و به دنبال آن، منجر به رهائش و مهاجرت این ترکیب ویتامینی از فاز داخلی به فاز بیرونی امولسیون‌های دوگانه و در نتیجه،

های کمپلکسی تشکیل شده در این pH کوچکتر از توده های به وجود آمده در pH برابر ۴ بودند اما اندازه آنها بزرگتر از توده هایی بود که در pH برابر ۶ به دست آمدند.

در pH برابر ۶، امکان تاثیر متقابل بین چندین گروه با بار مثبت بر روی شاخه پروتئینی آب پنیر و گروه های کربوکسیلی با بار منفی بر روی پکتینی که کاملا منفی است، وجود دارد. این اثرات متقابل نیروی محرکه لازم برای تشکیل کمپلکس-های قوی بیوپلیمری را فراهم می نماید. به عبارت دیگر، این پیوندهای جاذبه ای قوی اما محدود، قادر به جداسازی فازهای امولسیون نیستند اما می توانند توده های مولکولی کوچکی را تشکیل دهند که برای پایداری امولسیون کافی است. در طرف مقابل، توده های تشکیل شده در pH برابر ۲، خیلی بزرگ بوده و دارای قابلیت جذب مولکولی محدودی در سطح تماس قطرات فاز پراکنده هستند و لذا نمی توانند به عنوان یک امولسیفایر مناسب عمل نمایند. در نتیجه، تنها کمپلکس پکتین-پروتئین آب پنیر در pH برابر ۶ می تواند نقش یک امولسیفایر خوب را ایفا نموده و منجر به تشکیل امولسیون-هایی با کوچکترین اندازه قطرات شود. این نتایج کاملا با یافته های لوتز و همکاران (۲۰۰۹) مطابقت دارد. علاوه بر این، کمپلکس های تشکیل شده در pH برابر ۶ دارای بار منفی بوده و بر اساس نیروهای دافعه بین قطرات، پایداری امولسیون را بهبود می دهند. اما در pH برابر ۸، گروه های آمینی موجود بر روی پروتئین آب پنیر، پروتونه نبوده و گروه های کربوکسیلی کاملا یونیزه شده هستند. بنابراین، بار کلی سطحی در سیستم، منفی می باشد.

در بررسی تاثیر نوع و فرمولاسیون سورفکتانت بر راندمان انکپسولاسیون اسید فولیک در امولسیون های دوگانه پکتین-پروتئین آب پنیر، نتایج نشان داد که میکروامولسیون های هر دو نوع سورفکتانت اسپن و PGPR (با اندازه قطرات کمتر از ۱۰۰ نانومتر) دارای راندمان انکپسولاسیون بالاتری بودند که می تواند ناشی از پایداری ترمودینامیکی این امولسیون ها باشد در حالیکه نمونه های مشابه نانوامولسیون آنها (با اندازه قطرات ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ نانومتر) تنها دارای پایداری سینتیکی هستند. همچنین به طور کلی، سورفکتانت PGPR دارای عملکرد بهتری بود که احتمالا به خاطر شاخه های منشعب شده آن و در نتیجه، محافظت بهتر و بیشتر سطح تماس بین آب/روغن و

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

نکته جالب توجه این بود که با افزایش pH از ۶ به ۹، راندمان انکپسولاسیون اسید فولیک در امولسیون های دوگانه تولیدی به طور مداوم کاهش یافت. فاکتور pH تاثیر قابل توجهی هم بر تعادل بار الکتریکی سطحی بیوپلیمرها و هم بر اثر متقابل بین آنها دارد. علاوه بر این، بار الکتریکی سطح قطرات امولسیون (پتانسیل زتا) می تواند پایداری امولسیون را تحت تاثیر قرار دهد [۱۲ و ۱۹]. در مرحله انجام پیش آزمون-ها، نتایج نشان داد که در pH برابر ۴ یعنی نقطه ایزوالکتریک محلول ترکیبی پکتین-پروتئین آب پنیر، این دو بیوپلیمر تقریبا خنثی بوده و کواکسولاسیون کمپلکسی رخ می دهد که منجر به تشکیل توده های رسوبی نسبتا بزرگی می شود. به دلیل اینکه جذب این توده های بیوپلیمری بزرگ در سطح تماس روغن/آب ضعیف و ناقص می باشد، نیروی دافعه بین قطرات نیز ناکافی بوده و در نهایت، منجر به تشکیل قطرات نسبتا بزرگی از فاز پراکنده می شود که مناسب نیستند [۱۵ و ۱۶]. از طرف دیگر، در نقاط پایین تر از نقطه ایزوالکتریک پروتئین های آب پنیر یعنی در pH برابر ۲، پروتئین های غالباً دارای بار مثبت بوده و بار تعادلی سطح پکتین، منفی می باشد که در مجموع باعث ایجاد پتانسیل زتای مثبت خواهد شد. توده-



علامت مثبت قبل از ضریب مربوطه در مدل قرار می‌گیرد و علامت منفی، نشان‌دهنده منفی بودن تاثیر متغیر مربوطه است. این تغییرات کاملا با نتایج شکل ۲ هماهنگ است. با بررسی نتایج جدول ۴ و شکل ۳، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که ترتیب اهمیت تاثیر فاکتورهای مستقل بر راندمان انکپسولاسیون اسید فولیک در داخل امولسیون‌های دوگانه تولیدی به صورت زیر است (درصد حجمی فاز پراکنده دارای بیشترین تاثیر معادل ۳۶٪ است):

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

جلوگیری از پدیده به هم پیوستن و بزرگ شدن قطرات می‌باشد [۲۲].

### ۳-۴- تعیین مهمترین فاکتورها و اثر متقابل آنها

به ترتیب در جدول های ۳ و ۴، ضرایب برآورد شده مدل مربوط به میانگین راندمان انکپسولاسیون و آنالیز واریانس متغیرهای مستقل آورده شده است.

همان‌طور که در جدول ۳ دیده می‌شود، با توجه به عدد ثابت بدست آمده، میانگین کلی راندمان انکپسولاسیون برای تمام تیمارها معادل ۸۸/۲۹ درصد می‌باشد. زمانی که تاثیر متغیرهای مستقل بر راندمان انکپسولاسیون اسید فولیک مثبت است، یک

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

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

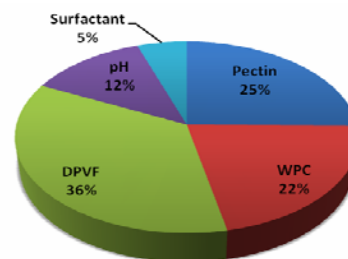
**Table 4** Analysis Of Variance (ANOVA)

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

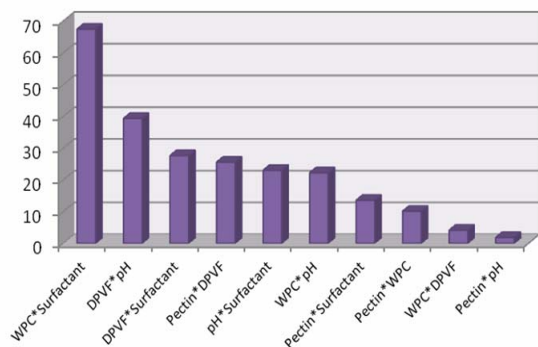
همچنین، براساس نتایج شکل ۴، بیشترین اثر متقابل در بین متغیرهای مستقل مربوط به پروتئین آب پنیر-سورفکتانت با شدت تاثیر متقابل حدود ۶۷ درصد و کمترین آن مربوط به پکتین-pH با شدت کمتر از ۵ درصد است.

### ۳-۵- نتایج بهینه سازی با تاگوچی

از طریق تحلیل نتایج به دست آمده با روش تاگوچی، نتایج نشان داد که شرایط بهینه برای داشتن فرمولاسیونی به حداکثر



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



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

راندمان انکپسولاسیون عبارت است از پکتین با غلظت ۱ درصد وزنی، کنسانتره پروتئین آب پنیر با غلظت ۴ درصد وزنی درصد حجمی فاز پراکنده معادل ۱۵٪، pH برابر ۶ و به- کارگیری سورفکتانت PGPR با تهیه میکروامولسیون اسید فولیک به عنوان فاز داخلی امولسیون های دوگانه نهایی (جدول ۵).

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

**Table 5** Optimum conditions and performance

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

Sum of contribution from all factors: 10.775

Current total mean of efficiency: 88.289

Predicted result in optimum conditions: 99.064

قطرات کوچک تر می شود. در نهایت اینکه شرایط بهینه برای دستیابی به بالاترین راندمان انکپسولاسیون اسید فولیک از طریق امولسیون های دوگانه عبارت بود از غلظت پکتین ۱٪، غلظت پروتئین آب پنیر ۴٪، میزان فاز پراکنده ۱۵٪، pH برابر ۶ و سامانه سورفکتانت PGPR با میکروامولسیون بعنوان فاز داخلی.

## ۵- منابع

- [1] Gujska, E., J. Michalak, et al. (2009). "Folates Stability in Two Types of Rye Breads During Processing and Frozen Storage." *Plant Foods for Human Nutrition* 64(2): 129-134.
- [2] Pérez-Masiá, R., R. López-Nicolás, et al. (2015). "Encapsulation of folic acid in food hydrocolloids through nanospray drying and electrospraying for nutraceutical applications." *Food Chemistry* 168: 124-133.
- [3] McClements, D. J. (2012). "Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities." *Soft Matter* 8(6): 1719-1729.
- [4] McClements, D. J. (2015). "Encapsulation, protection, and release of hydrophilic active

## ۴- نتیجه گیری کلی

از آنجایی که اسید فولیک یک ترکیب زیست فعال و حیاتی برای بدن انسان می باشد، در این پژوهش، روش تاگوچی برای بهینه سازی انکپسولاسیون اسید فولیک از طریق امولسیون های دوگانه آب در روغن در آب به کار گرفته شد. متغیرهای مستقل عبارت بودند از غلظت پکتین و غلظت پروتئین آب پنیر (کاربرد همزمان هر دو به صورت یک کمپلکس بیوپلیمری دولایه)، درصد حجمی فاز پراکنده، pH و نوع سامانه سورفکتانت. داده های به دست آمده نشان داد که مهمترین پارامتر تاثیرگذار بر راندمان انکپسولاسیون اسید فولیک، میزان فاز پراکنده (۳۶ درصد) بوده و نوع سامانه سورفکتانت با ۵ درصد دارای کمترین تاثیر بود. همچنین، آنالیز نتایج نشان داد که بین کنسانتره پروتئین آب پنیر و سورفکتانت و به دنبال آن بین میزان فاز پراکنده و pH یک اثر متقابل قوی وجود داشت. موضوع مهم دیگر این بود که در pH برابر ۶، بیشترین راندمان انکپسولاسیون به دست آمد زیرا در این شرایط، کمپلکسی قوی بین پکتین و پروتئین آب پنیر تشکیل می گردد که منجر به تولید امولسیون های دوگانه قوی با پایداری مناسب و اندازه

- [14] Rajabi, H., Ghorbani, M., Jafari, S.M., Sadeghi, A.R., Rajabzadeh, G. (2015). Retention of saffron bioactive components by spray drying encapsulation using maltodextrin, gum Arabic and gelatin as wall materials. *Food Hydrocolloids*, 51, 327–337.
- [15] Salminen, H. and J. Weiss (2014). "Effect of Pectin Type on Association and pH Stability of Whey Protein—Pectin Complexes." *Food Biophysics* 9(1): 29-38.
- [16] Teng, Z., R. Xu, et al. (2015). "Beta-lactoglobulin-based encapsulating systems as emerging bioavailability enhancers for nutraceuticals: a review." *RSC Advances* 5(44): 35138-35154
- [17] Bouyer, E., G. Mekhloufi, et al. (2012). "Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: Alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field?" *International Journal of Pharmaceutics* 436(1–2): 359-378.
- [18] Hosseini, S. M. H., Z. Emam-Djomeh, et al. (2015). "Nanocomplexes arising from protein-polysaccharide electrostatic interaction as a promising carrier for nutraceutical compounds." *Food Hydrocolloids* 50: 16-26.
- [19] Lutz, R., A. Aserin, et al. (2009). "Release of electrolytes from W/O/W double emulsions stabilized by a soluble complex of modified pectin and whey protein isolate." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 74(1): 178-185.
- [20] Schuch, A., J. Wrenger, et al. (2013). "Production of W/O/W double emulsions. Part II: Influence of emulsification device on release of water by coalescence." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*(0).
- [21] Hosseini, A., S. M. Jafari, et al. (2015). "Application of image processing to assess emulsion stability and emulsification properties of Arabic gum." *Carbohydrate Polymers* 126: 1-8.
- [22] Sapei, L., M. A. Naqvi, et al. (2012). "Stability and release properties of double emulsions for food applications." *Food Hydrocolloids* 27(2): 316-323.
- components: Potential and limitations of colloidal delivery systems." *Advances in Colloid and Interface Science* 219(0): 27-53.
- [5] Jafari, S. M., E. Assadpoor, et al. (2008). "Re-coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification." *Food Hydrocolloids* 22(7): 1191-1202.
- [6] Garti, N. and A. Aserin (2013). Double Emulsions. *Encyclopedia of Colloid and Interface Science*. T. Tadros, Springer Berlin Heidelberg: 303-337.
- [7] Hemar, Y., L. Cheng, et al. (2010). "Encapsulation of Resveratrol Using Water-in-Oil-in-Water Double Emulsions." *Food Biophysics* 5(2): 120-127.
- [8] Sonam, H. Chaudhary, et al. (2014). "Taguchi design for optimization and development of antibacterial drug-loaded PLGA nanoparticles." *International Journal of Biological Macromolecules* 64: 99-105.
- [9] Esfanjani, A. F., S. M. Jafari, et al. (2015). "Nano-encapsulation of saffron extract through double-layered multiple emulsions of pectin and whey protein concentrate." *Journal of Food Engineering* 165: 149-155.
- [10] Mohammadi, A., S. M. Jafari, et al. (2016). "Application of nano-encapsulated olive leaf extract in controlling the oxidative stability of soybean oil." *Food Chemistry* 190: 513-519.
- [11] Mahdavee Khazaei, K., Jafari, S.M., Ghorbani, M., Kakhki, A.H., (2014). Application of maltodextrin and gum Arabic in microencapsulation of saffron petal's anthocyanins and evaluating their storage stability and color. *Carbohydrate Polymers*, 105, 57–62.
- [12] Lutz, R., A. Aserin, et al. (2009). "Double emulsions stabilized by a charged complex of modified pectin and whey protein isolate." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 72(1): 121-127.
- [13] Matias, R., P. R. S. Ribeiro, et al. (2014). "A UV spectrophotometric method for the determination of folic acid in pharmaceutical tablets and dissolution tests." *Analytical Methods* 6(9): 3065-3071.

## Optimization of Folic Acid Nano-encapsulation by A Taguchi Approach

Assadpour, E. <sup>1</sup>, Maghsoudlou, Y. <sup>2</sup>, Jafari, S. M. <sup>3\*</sup>, Ghorbani, M. <sup>4</sup>, Aalami, M. <sup>5</sup>

1. Assistant Prof Department of Food Materials and Process Design Engineering, University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
  2. Prof. Department of Food Materials and Process Design Engineering, University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
  3. Associate Prof Department of Food Materials and Process Design Engineering, University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
  4. Associate Prof Department of Food Materials and Process Design Engineering, University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
  5. Associate Prof Department of Food Materials and Process Design Engineering, University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
- (Received: 2016/05/15 Accepted: 2016/08/16)

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

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

---

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

1. FA

2. Whey Protein Concentrate

3. Poly Glycerol Poly Ricinoleate

4. EE