

بررسی پایداری اکسیداتیو روغن خاکشیر (*Descurainia sophia*) درون پوشانی شده با استفاده از ترکیب صمغ عربی و پروتئین آب پنیر غلیظ شده و اثر اولتراسوند بر شاخص اکسیداسیون

ساناز مالک^۱، زهرا امام جمعه^{۲*}، غلامرضا عسکری^۲ و امیر رضوان خواه^۲

۱- دانش آموخته دکتری، پردیس ارس، دانشگاه تهران، آذربایجان شرقی، ایران

۲- استاد، استادیار و دانش آموخته دکتری، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج،

ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۲/۱۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۶/۵

چکیده

هدف این پژوهش، بررسی اثر دو ترکیب بیوپلیمری صمغ عربی (GA) و پروتئین آب پنیر غلیظ شده (WPC) و مدت زمان اولتراسوند بر پایداری اکسیداتیو روغن خاکشیر در قالب یک امولسیون روغن در آب (O/W) است. تولید امولسیون بر این اساس بوده است: بهینه سازی سطح پاسخ برای ۳ فاکتور مستقل، در ۳ سطح شامل غلظت صمغ عربی و پروتئین آب پنیر ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد وزنی/وزنی و برای اولتراسوند، مدت زمان ۰، ۱۵ و ۳۰ ثانیه و اندازه گیری پراکسید (میلی اکی والان بر کیلوگرم روغن) به عنوان پاسخ. نقطه بهینه بر اساس انتخاب کمترین مقدار پراکسید، به این صورت به دست آمد: ۱۹/۷۸ درصد (وزنی/وزنی) پروتئین، ۱۱/۰۸ درصد (وزنی/وزنی) صمغ عربی و ۱/۰ ثانیه مدت زمان اولتراسوند؛ در این نقطه مقدار عدد پراکسید، ۰/۵۹ میلی اکی والان بر کیلوگرم روغن پیش بینی شد. اندازه قطره های امولسیون و پتانسیل زتای نمونه بهینه به ترتیب ۹۱۶ نانومتر و ۴۸- میلی ولت بود. طبق نتایج به دست آمده، هر دو ترکیب پروتئین و صمغ اثر بازدارندگی نسبت به اکسیداسیون نشان دادند اما اعمال تیمار اولتراسوند، باعث افزایش آن شده است. به علاوه، تأثیر پروتئین در کنترل اکسیداسیون، به صورت قابل توجهی معنی دار است که می تواند به خاصیت آنتی اکسیدانی اجزای آن (بتا لاکتوگلوبولین) مربوط باشد. پایداری اکسیداتیو در ۲۸ روز ماندگاری در شرایط تشدید کننده (دمای ۵۰ درجه سلسیوس)، مشخص کرد که استفاده از ترکیب این دو بیوپلیمر می تواند جلو اکسیداسیون روغن با غیراشباعی بالا را به صورتی چشمگیر بگیرد.

واژه های کلیدی

آنتی اکسیدان، امولسیون روغن در آب، بهینه سازی سطح پاسخ، پتانسیل زتا

مقدمه

امروزه روغن های گیاهی خصوصاً دانه های روغنی به دلیل داشتن نسبت بالای غیراشباعی، مورد استفاده دارویی و تغذیه ای قرار می گیرند (Bakry *et al.*, 2016). روغن خاکشیر به عنوان روغنی با منشأ گیاهی، به دلیل داشتن غیر اشباعی بالا و نسبت خوب بین لینولنیک اسید (۱۷/۲۸ درصد) و آلفا لینولنیک اسید (۴۷/۷۸ درصد) اخیراً توجه زیادی را جلب کرده است (Bekker *et al.*, 2005; Dunford, 2015; Leizer *et al.*, 2000)

خاکشیر گیاهی است خودرو و بومی ایران که خواص عملکردی بسیاری دارد، از جمله کنترل فشارخون، دفع سنگ کلیه، جلوگیری از آسم، کاهش ادم، بهبود سیستم دفع ادرار، تسکین سرفه و جلوگیری از التهاب (Lee *et al.*, 2013). ریزدانه های این گیاه روغنی دارد به رنگ زرد که حاکی از بالابودن مقدار کارتنوئید در آن است (Bekker *et al.*, 2005; Gong *et al.*, 2015)

پودر ریزپوشانی شوند و با روش‌های خشک کردن انجمادی یا پاششی در مواد غذایی هدف به کار روند (Bakry *et al.*, 2016). پروتئین‌هایی مانند پروتئین‌های شیر (کازئین، پروتئین آب‌پنیر)، ژلاتین، و پروتئین سویا خواص امولسیفایری و تشکیل فیلم دارند که می‌توانند به صورت ترکیبی با پلی ساکاریدها با در نظر گرفتن برهمکنش‌های بین مولکولی به کار روند (Comunian & Favaro-Trindade, 2016; Eratte *et al.*, 2015; Karaca *et al.*, 2013). مشخص شده است که پروتئین‌های آب‌پنیر دارای خواص آنتی‌اکسیدانی هستند که به همین دلیل دارای کاربردهای وسیعی در حوزه ریزپوشانی و نانو کپسوله کردن ریزمغذی‌ها و ترکیبات دارویی هستند (Adjonu *et al.*, 2016; Khalesi *et al.*, 2014; Kalesi *et al.*, 2014). پلی ساکاریدها نیز می‌توان به صمغ عربی^۱، مالتودکسترین، آلژینات، و کیتوزان اشاره کرد که اخیراً به صورت گسترده برای تولید سامانه‌های امولسیون و رسانش دارو مورد توجه‌اند (Darbasi *et al.*, 2017; Vahedifar *et al.*, 2017). صمغ عربی و کیتوزان به خصوص دارای خواص کشش سطحی و امولسیفایری هستند و می‌توانند برای پایدار کردن سامانه‌های امولسیونی (جلوگیری از ناپایداری فاز) به کار گرفته شوند (Charoen *et al.*, 2011; Eratte *et al.*, 2015; Ozturk *et al.*, 2015; Premi & Sharma, 2017; Rajabi *et al.*, 2015).

صمغ عربی علاوه بر داشتن پیکره پلی ساکاریدی متشکل از واحدهای α -D-گالاکتوپیرانوزیل که به صورت پیوندهای ۱ به ۶ به هم متصل شده‌اند، دارای یک بخش کوچک پروتئینی است که باعث شده این هتروپلی ساکارید خواص کشش سطحی نیز از خود نشان دهد و عمدتاً غلیظ کننده در سامانه‌های غذایی به کار رود (Charoen *et al.*, 2011; Eratte *et al.*, 2015; Klein *et al.*, 2010; Ozturk *et al.*, 2015; Premi & Sharma, 2017).

کاراکا و همکاران (Karaca *et al.*, 2013) روغن بذر کتان را با به کارگیری یک ماتریکس دیواره‌ای تشکیل شده از

اسیدهای چرب، دارای مزایای سلامت بخشی زیادی از جمله پایین آورنده فشارخون، کاهش کلسترول و جلوگیری از التهاب‌ها هستند و همچنین باعث بهبود عملکرد مغز می‌شوند. اما این روغن به دلیل غیراشباعی بالا (دارای حدود ۶۵ درصد اسید چرب چند غیراشباعی)، بسیار مستعد اکسیداسیون است و در شرایط اکسیداتیو، کیفیت تغذیه‌ای و دارویی خود را از دست می‌دهد (Liang *et al.*, 2015). ریزپوشانی و تولید امولسیون، رویکردی برای حفظ و نگهداری ترکیبات حساس است و سالیان متمادی است که در عرصه دارویی کاربرد دارد (Bakry *et al.*, 2016). تولید غذا-داروها امروزه شکل جدیدتری به این جنبه داده است و در سال‌های اخیر شاهد تولید مواد غذایی غنی شده از ترکیباتی هستیم که مواد زیست فعال شناخته شده‌اند و می‌توانند اثر عملکردی در غذا و همچنین در بدن، بعد از جذب شدن، داشته باشند. این مواد غذایی، اغلب به صورت مایع (سامانه امولسیون) و نیز به صورت سامانه‌های نیمه جامد (عمدتاً ژل‌ها) تولید می‌شوند (McClements, 2017). همان‌طور که اشاره شد، در وهله نخست، حفظ این ترکیبات نقطه بحرانی محسوب می‌شود. نکته با اهمیت دیگر در این زمینه، جنبه قابلیت دسترسی زیستی^۱ این ترکیبات است که بنا به هدف مشخص برای جذب شدن در خون، باید بتوانند رهایش یابند (McClements, 2015). انتخاب پوشش‌ها و دیواره‌ها^۲ می‌تواند بسیار با اهمیت باشد زیرا باید سامانه‌های پایداری (از نظر فاز) را تولید کنند و نیز بتوانند ماده زیست فعال مورد نظر را با بالاترین راندمان ریزپوشانی پوشش دهند و در شرایطی مثل آنچه در معده حاکم است، مانع از گسیختگی و تخریب کامل دیواره شوند تا جزء مورد نظر در کولون (روده بزرگ) بتواند رهایش یابد و جذب شود (McClements, 2015). باید اشاره کرد که ترکیبات زیست فعال می‌توانند به صورت ترکیبات پایدار شده در نوشیدنی‌ها (با دیواره‌ها و امولسیون کننده‌ها) و یا به صورت

مالتودکسترین، صمغ عربی و پروتئین کنسانتره آب پنیر^۵ را روی رفتار درون پوشانی و پایداری اکسیداتیو روغن نارگیل درون پوشانی شده (به روش پاششی) بررسی کردند و نشان دادند بالاترین پایداری اکسیداتیو برای ترکیب مالتودکسترین و صمغ عربی به دست آمده است. ترکیب مالتودکسترین و صمغ عربی، نسبت به ترکیب مالتودکسترین و پروتئین، راندمان درون پوشانی بالاتری را به دست داده است. هدف از این مطالعه، بررسی پایداری اکسیداتیو روغن خاکشیر درون پوشانی شده با استفاده از ترکیب بیوپلیمری صمغ عربی و پروتئین کنسانتره آب پنیر به عنوان دیواره و امولسیفایر و همچنین بررسی تأثیر اولتراسوند بر شاخص اکسیداسیون (عدد پراکسید) است.

مواد و روش‌ها

صمغ عربی و پروتئین کنسانتره آب پنیر از شرکت‌های سیگما آمریکا و هیلمار کالیفرنیا تهیه شدند. آب مقطر دیونیزه از شرکت ایرانی پارس شیمی فراهم شد. همه مواد شیمیایی اعم از ایزواکتان، ایزوپروپانول، کلروفرم، هگزان و متانول از شرکت‌های معتبر مرک (آلمان) و نوترون (ایران) با درجه آنالیز شیمیایی، خریداری شدند. خاکشیر از بازار محلی کرج تهیه شد که دارای برند ایرانی (بشرویه، خراسان جنوبی، ایران) بود. روغن خاکشیر استفاده شده برای ریزپوشانی، از طریق روش پرس سرد با دستگاه پرس مارپیچ مقیاس آزمایشگاهی (Model 65 mm, Iran Cold Pressing Co, Tehran, Iran) در دمای ۴۰ درجه سلسیوس به دست آمد.

تهیه امولسیون روغن در آب (O/W)

برای این کار، ابتدا صمغ عربی و پروتئین کنسانتره آب پنیر در آب دو بار تقطیر شده حل شدند و برای هیدراسیون بیشتر، نمونه‌های بیوپلیمری به مدت ۱۲ ساعت در یخچال با دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند. روغن خاکشیر با نسبت ۴:۱ دیواره به روغن (درصد وزنی/وزنی بر اساس

ایزوله پروتئین نخود^۱ و پروتئین عدس^۲ و مالتودکسترین ریزپوشانی کردند که امولسیون تشکیل شده به روش انجمادی خشک گردید. نتایج حاکی از این بود که روغن ریزپوشانی شده دارای پایداری اکسیداتیو بالاتری از روغن آزاد در دوره نگهداری برای ۲۵ روز بود. انوار و کونز (Anwar & Kunz, 2011) تأثیر روش خشک کردن از طریق خشک کن پاششی و انجمادی را برای ریزپوشانی روغن ماهی غنی از EPA^۳ و DHA^۴ بررسی کردند و نشان دادند روغن ریزپوشانی شده به روش پاششی پایداری اکسیداتیو بالاتری نسبت به روش انجمادی دارد که دلیل آن ساختار متخلخل پودر به دست آمده با روش انجمادی بوده است. اما تأثیر حرارت در روش پاششی مورد توجه بوده است. قربانزاده و همکاران (Ghorbanzade *et al.*, 2017) روغن ماهی را به دلیل بوی شدید و تند شدن سریع آن از طریق تولید نانولیپوزوم، نانوکپسوله کردند و به ماست افزودند. نتایج این بررسی نشانگر حفظ روغن نانوکپسوله شده از طریق ارزیابی مقادیر اسیدهای چرب چند غیراشباعی EPA و DHA به دست آمده برای ۲ نمونه ماست دارای سامانه نانولیپوزوم و روغن آزاد بود. مقدار پراکسید، سینرسیس و اسیدیته در نمونه دارای روغن نانوکپسوله شده به صورت معنی دار پایین بود. در کل، طبق مطالعات پیشین، تولید امولسیون از روغن‌های حساس به اکسیداسیون (دارای اسیدهای چرب چند غیراشباعی) باعث حفظ آنها شده است. استفاده از صمغ‌ها و پروتئین‌های طبیعی، به صورت خاصی در صنعت غذا مورد توجه بوده است و اخیراً تولید سیستم‌های امولسیونی (هم به صورت مایع در شکل نوشیدنی‌های غنی شده با امگا ۳ و امگا ۶ و هم به صورت امولسیون خشک شده و سپس افزودن آن به سیستم‌های غذایی) در حوزه سلامتی اهمیت بالایی کسب کرده است (Esfanjani *et al.*, 2017; Kiokias *et al.*, 2017; Sessa *et al.*, 2014). پرمی و شارما (Premi & Sharma, 2017) تأثیر ترکیب مختلف

1- Chickpea protein isolate (CPI)
3- Eicosapentaenoic acid
5- Whey protein concentrate

2- Lentil protein isolate (LPI)
4- Docosahexaenoic acid

قطر قطره‌های امولسیون انتخاب و به اندازه ۱۰ برابر رقیق شدند تا برای مشاهده دقیق با استفاده از میکروسکوپ نوری (Zeiss Camera Lens, Germany) با بزرگنمایی ۴۰ برابر آماده شوند. اندازه قطره‌های امولسیون در محیط امولسیون با نرم‌افزار Image Pro Plus تعیین شد (Guo *et al.*, 2016).

پایداری امولسیون

برای بررسی پایداری امولسیون، چند نمونه انتخاب و در دمای ۴ و ۲۵ درجه سلسیوس، میزان پایداری و جدایی فازی آنها اندازه‌گیری شد. نمونه‌ها برای ۲۰ روز نگهداری شدند (Carneiro *et al.*, 2013).

$$(1) \quad \left(\frac{H_1}{H_0}\right) \times 100 = \text{میزان پایداری امولسیون (درصد)}$$

که در آن، H_0 : ارتفاع اولیه و H_1 : ارتفاع مقدار جدا شده از فاز سرمی امولسیون است.

اندازه‌گیری کشش سطحی

کشش سطحی (میلی نیوتن بر متر) چهار نمونه شامل نقطه بهینه، نمونه‌های ۷، ۱۲ و نمونه مرکزی سنجیده و با هم مقایسه شدند. ابتدا کشش سطحی آب به‌عنوان مرجع با چگالی ۱ گرم بر سانتی متر مکعب با استفاده از یک پلیت تیتانیومی با خصوصیات مشخص (ضخامت ۱۱/۸۷ میلی‌متر و عرض ۰/۱۳ سانتی‌متر) با دستگاه کشش سطحی پویای مایعات مدل K12 ساخت شرکت Kruss کشور آلمان اندازه‌گیری شد. نمونه‌های امولسیونی با نمونه مرجع (آب)، دارای کشش سطحی ۷۲/۸۰ میلی‌نیوتن بر متر، مقایسه شدند (Bai *et al.*, 2017).

اندازه‌گیری پراکسید روغن در امولسیون O/W

مقدار پراکسید روغن بر اساس روش اسپکتروفوتومتریک فراداسیون بین‌المللی لبنیات^۱ اندازه‌گیری شد (Frascareli *et al.*, 2012; Shantha & DECKER, 1994) ابتدا

نمونه‌های امولسیونی در شرایط ۱۵۰۰۰ g به مدت ۱۰

گرم وزن امولسیون) به محلول‌های بیوپلیمری اضافه شد و با استفاده از اولتراتوراکس (IKA T 25 digital Germany-Deutschland) ULTRA TURRAX، با سرعت هوموژنیزاسیون ۱۸۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۵ دقیقه، امولسیون‌ها تشکیل شدند و تیمار اولتراسوند (TopSonic) UPH-400 در مدت زمان‌های ۱۵ و ۳۰ ثانیه برای پراکنده شدن بهتر و بررسی اثر آن روی خصوصیات امولسیون اعمال شد و امولسیون‌ها برای آزمون‌های بعدی استفاده شدند (Bae & Lee, 2008; Carneiro *et al.*, 2013; Karaca *et al.*, 2013; Premi & Sharma, 2017; Tonon *et al.*, 2011).

اندازه‌گیری گرانروی امولسیون

گرانروی نمونه‌های بهینه با استفاده از ویسکومتر بروکفیلد در شرایط دمای ۲۵ درجه سلسیوس و سرعت برشی ۱۰۰۰-۰ بر ثانیه اندازه‌گیری و به‌صورت نمودار سرعت برشی - گرانروی ارائه شد.

اندازه قطره‌ها و پتانسیل زتای نمونه بهینه

برای بررسی میانگین اندازه قطره‌های امولسیون و توزیع چندگانه^۱ آنها در محیط، از دستگاه DLS^۲ ساخت شرکت آمریکایی Brookhaven بر اساس تفرق نور استفاده شد. برای این کار، نمونه امولسیونی با استفاده از آب مقطر، ۱۰۰ برابر رقیق شد تا نور با طول موج ۶۵۹ نانومتر و زاویه پراکنش ۹۰ درجه بتواند عبور کند. اندازه‌گیری‌ها ۵ بار تکرار شد. میانگین قطر قطره‌ها و مقدار شاخص توزیع (PDI)، با استفاده از نرم‌افزار مربوط (9kpsdw, v.5.20) تعیین گردید. برای اندازه‌گیری پتانسیل زتای نمونه بهینه، دستگاه DLS در مد زتا با به کارگیری سل مخصوص (zeta cell) به کار گرفته شد. آزمایش با ۳ تکرار دنبال و مقدار مورد نظر به‌صورت میانگین و با انحراف معیار گزارش شد (Vahedifar *et al.*, 2017).

بررسی امولسیون به‌صورت مشاهده چشمی

چند نمونه امولسیون برای بررسی چشمی و برای تعیین

1- Polydispersity index: PDI

2- Dynamic light scattering: DLS

3- International Dairy Federation (IDF)

اندازه‌گیری شده در ۵۰۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفوتومتر به ترتیب، برای تیمارها و نمونه شاهد هستند.

بررسی پایداری اکسیداتیو روغن به تله افتاده در امولسیون O/W

نمونه‌های امولسیونی برای بررسی پایداری اکسیداتیو روغن در ۲۸ روز نگهداری در دمای ۵۰ درجه سلسیوس، در ظرف‌های مخصوص در دار (با سرفضای مناسب برای برقراری شرایط اکسیداتیو) قرار داده شدند. در فاصله‌های زمانی ۷ روزه، پراکسید طبق روش اشاره شده اندازه‌گیری شد (Carneiro et al., 2013; Premi & Sharma, 2017).

تجزیه و تحلیل

در این مطالعه، از نرم‌افزار Design expert 11 به‌منظور بهینه‌سازی سطح پاسخ (RSM) استفاده شد. سه فاکتور مستقل غلظت صمغ عربی، غلظت پروتئین کنسانتره آب‌پنیر و مدت زمان تیمار اولتراسوند در ۳ سطح به ترتیب ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد وزنی/وزنی برای دو ترکیب بیوپلیمری صمغ و پروتئین و مدت زمان‌های، ۱۵ و ۳۰ ثانیه برای اولتراسوند در نظر گرفته شد (جدول ۱). فاکتور وابسته پراکسید برای بررسی پایداری اکسیداسیونی روغن اندازه‌گیری شد. آزمایش‌ها از طریق طرح باکس بنکن (Box Behnken) و با ۳ نقطه مرکزی در ۱۵ دور اجرا شد. با بهینه‌سازی بر اساس کمترین مقدار پراکسید، نقطه بهینه در ۳ تکرار به‌منظور تأیید، در سطح آزمایشگاهی آزمایش شد. تمام مقادیر گزارش شده به‌صورت میانگین و انحراف معیار هستند و مقایسه میانگین از طریق آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون دانکن با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام گرفت.

دقیقه سانتریفوژ شدند تا دو فاز شوند. فاز رویی جدا شده حاوی روغن به تله افتاده در کمپلکس بیوپلیمری صمغ عربی و پروتئین بود که از آن ۰/۵ گرم در ۵ میلی‌لیتر آب مقطر حل گردید و به مدت ۱۰ دقیقه ورتکس شد. پس از آن، ۱/۵ میلی‌لیتر از مخلوط ایزواکتان: ایزوپروپانول (با نسبت ۱:۲) به ۳۰۰ میکرولیتر نمونه اضافه و به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس و در ۴۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. نمونه‌های آماده شده دارای ۲ فاز متشکل از فاز رویی آلی دارای ترکیبات هیدروپراکسید تولید شده و فاز پایین حاوی ترکیبات بیوپلیمری بود. از فاز سوپرناتانت به اندازه ۰/۳ گرم به ۹/۶ میلی‌لیتر کلروفرم: متانول با نسبت ۳:۷ در داخل لوله‌های آزمایشی اضافه و خوب مخلوط شد. به هر یک از نمونه‌ها، ۵۰ میکرولیتر آمونیوم تیوسیانات و ۵۰ میکرولیتر آهن کلرید^۱ اضافه و بعد از ۵ دقیقه، تغییر رنگ در طول موج ۵۰۰ نانومتر خوانده شد. یک نمونه شاهد عیناً مثل مراحل ذکر شده فراهم گردید. مقدار پراکسید بر اساس رابطه (۲) به دست آمد:

$$\text{عدد پراکسید} = \frac{(A_{\text{Sample}} - A_{\text{Blank}}) \times m}{55.84 \times m_0 \times 2} \quad (2)$$

که در آن، m شیب منحنی محلول استاندارد (آهن III کلرید^۲) است که در غلظت‌های مختلف تهیه و جذب آن در ۵۰۰ نانومتر خوانده شد. در واقع محلول آهن III کلرید با غلظت‌های ۰-۲۵ میکروگرم فراهم شد تا ترکیبات هیدروپراکسیدی تولیدی برای نمونه‌های مورد نظر اندازه‌گیری شوند. m_0 وزن نمونه (مقدار وزن شده از فاز رویی حاوی ایزواکتان-ایزوپروپانول و ترکیبات هیدروپراکسید و پراکسیدی)، A_{sample} و A_{Blank} مقادیر

جدول ۱- سطوح و مقادیر متغیرهای مستقل

متغیرها	نماد	۱	۰	-۱
پروتئین کنسانتره آب‌پنیر (درصد وزنی/وزنی)	A	۲۰	۱۵	۱۰
درصد صمغ عربی (درصد وزنی/وزنی)	B	۲۰	۱۵	۱۰
مدت زمان اولتراسوند (ثانیه)	C	۳۰	۱۵	۰

نتایج و بحث

اندازه‌گیری پراکسید نمونه‌های امولسیون

ترکیبات هیدروپراکسید در اثر اکسیداسیون روغن تولید می‌شوند. این ترکیبات بیشتر در حضور عوامل اکسنده از جمله نور، دمای محیط، اکسیژن و غیره تولید می‌شوند. در این مطالعه، هدف آن است که واکنش‌های اکسیداسیونی از طریق تولید امولسیون روغن در آب با استفاده از دو

ترکیب پروتئین غلیظ شده آب‌پنیر و صمغ عربی کاهش داده شود. در واقع، عاملی فیزیکی (ترکیبات بیوپلیمری) ایجاد شود تا از رسیدن عوامل اشاره شده به روغن جلوگیری شود (Tonon et al., 2011). نتایج به دست آمده از اندازه‌گیری پراکسید نمونه‌ها در جدول (۲) ارائه و روند تغییرات در شکل سه بعدی و کنترل پلات (۱) نمایش داده شده است.

جدول ۲- سطوح متغیرهای مستقل و نتایج به دست آمده برای شاخص پراکسید

تیمار	درصد پروتئین کنسانتره (A)	درصد صمغ عربی (B)	مدت زمان اعمال اولتراسوند (C) (ثانیه)	مقدار پراکسید به دست آمده (میلی‌اکی‌والان بر کیلوگرم روغن)	مقدار پراکسید پیش‌بینی شده (میلی‌اکی‌والان بر کیلوگرم روغن)
۱	۱۰	۱۰	۱۵	۱/۱۵	۱/۱۵
۲	۲۰	۱۰	۱۵	۰/۹۰	۰/۸۹۱۸
۳	۱۰	۲۰	۱۵	۱/۰۱	۱/۰۲
۴	۲۰	۲۰	۱۵	۰/۹۱	۰/۹۰۵۸
۵	۱۰	۱۵	۰	۰/۷۰	۰/۶۹۳۰
۶	۲۰	۱۵	۰	۰/۶۰	۰/۶۰۵۵
۷	۱۰	۱۵	۳۰	۱/۲۰	۱/۱۹
۸	۲۰	۱۵	۳۰	۰/۹۰	۰/۹۰۷۰
۹	۱۵	۱۰	۰	۰/۶۸	۰/۶۸۲۸
۱۰	۱۵	۲۰	۰	۰/۶۳۰	۰/۶۲۸۸
۱۱	۱۵	۱۰	۳۰	۱/۰۹۰	۱/۰۹
۱۲	۱۵	۲۰	۳۰	۱/۰۳	۱/۰۲
۱۳	۱۵	۱۵	۱۵	۱/۰۲	۱/۰۲
۱۴	۱۵	۱۵	۱۵	۱/۰۱	۱/۰۲
۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱/۰۳۰	۱/۰۲

اثر دو متغیر مستقل غلظت‌های صمغ عربی و پروتئین کنسانتره آب‌پنیر بر مقدار پراکسید، با استفاده از مدل مربع بررسی شده است که از لحاظ آماری در سطح ۵ درصد مدل معنی‌دار و دارای برآزش و ضریب تبیین R^2 برابر با ۹۹/۸۹ درصد است (جدول ۳). با توجه به شکل (۱) و جدول (۳)، اثر خطی صمغ عربی و پروتئین آب‌پنیر در سطح اطمینان ۹۵ درصد معنی‌دار شده است ($p < 0.05$)؛ در واقع با افزایش غلظت هر دو ترکیب، مقدار پراکسید سیر نزولی پیدا می‌کند که می‌تواند به خاصیت

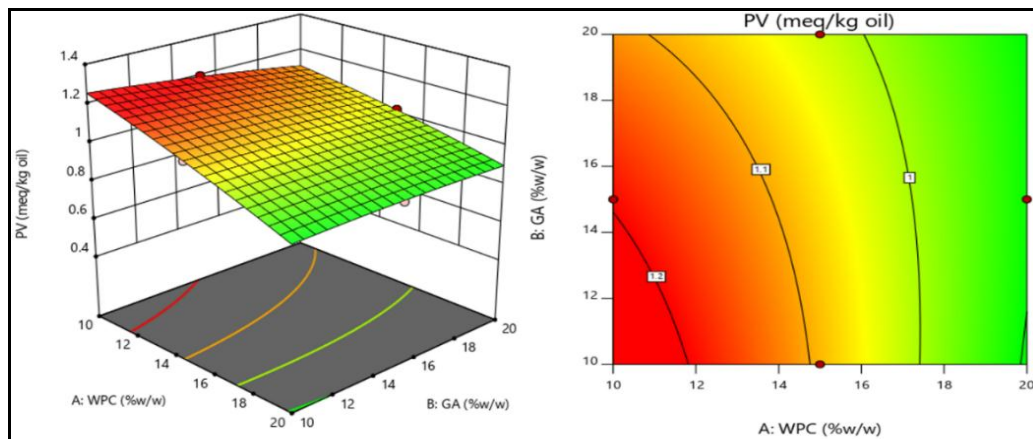
صمغ عربی در ایجاد یک حائل خوب در برابر اکسیداسیون و خاصیت آنتی‌اکسیدانی اجزای پروتئین استفاده شده نسبت داده‌شود (Mahdavi et al., 2016; Premi & Sharma, 2017). بررسی‌های آماری نشان می‌دهد که فقط درجه مربع پروتئین دارای اثر معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد است که می‌تواند مرتبط با خاصیت آنتی‌اکسیدانی اجزای پروتئین کنسانتره (بتالاکتوگلوبولین) باشد که از طریق ارائه گروه‌های سولفیدریلی (-SH)، خصوصیت (احیا کنندگی) خود را بروز دهند (Carneiro et al., 2017).

نشان می‌دهد هر دو ترکیب به صورت متقابل با افزایش در غلظت، باعث کاهش عدد پراکسید شده‌اند که با نتایج تحقیقات کارنیرو و همکاران (Carneiro et al., 2013) همخوانی دارد. (Waraho et al., 2011). اثر متقابل اکسنده را پیوند کنند می‌تواند عوامل صمغ-پروتئین نیز در سطح ۵ درصد معنی‌دار شد که

جدول ۳- نتایج آنالیز واریانس (ANOVA) مدل مربع (درجه دوم) برای پاسخ شاخص پراکسید

منبع	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	ارزش F	ارزش P
مدل خطی	۹	۰/۵۰۱۸	۰/۰۵۵۸	۵۰۲/۳۱	<۰/۰۰۰۱
WPC-A*	۱	۰/۰۷۰۳	۰/۰۷۰۳	۶۳۳/۴۵	<۰/۰۰۰۱
GA-B*	۱	۰/۰۰۷۴	۰/۰۰۷۴	۶۷/۰۵	۰/۰۰۰۴
Sonic-C*	۱	۰/۳۲۲۴	۰/۳۲۲۴	۲۹۰۴/۵۵	<۰/۰۰۰۱
درجه دوم:					
A ²	۱	۰/۰۰۱۰	۰/۰۰۱۰	۹/۰۶	۰/۰۲۹۸
B ²	۱	۰/۰۰۰۴	۰/۰۰۰۴	۳/۳۳	۰/۱۲۷۸
C ²	۱	۰/۰۸۵۹	۰/۰۸۵۹	۷۷۳/۶۰	<۰/۰۰۰۱
اثر متقابل:					
AB	۱	۰/۰۰۵۶	۰/۰۰۵۶	۵۰/۶۸	۰/۰۰۰۸
AC	۱	۰/۰۱۰۰	۰/۰۱۰۰	۹۰/۰۹	۰/۰۰۰۲
BC	۱	۰/۰۰۰۰	۰/۰۰۰۰	۰/۴۴۱۴	۰/۵۳۵۸
خطای باقی مانده	۵	۰/۰۰۰۶	۰/۰۰۰۱		
عدم برازش	۳	۰/۰۰۰۳	۰/۰۰۰۱	۱/۱۳	۰/۵۰۱۳
خطای خالص	۲	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۰۱		
کل	۱۴	۰/۵۰۲۴			
ضریب تبیین (R ²)		۰/۹۹۸۹			
ضریب تبیین تعدیل شده (R ² -Adj)		۰/۹۹۶۹			
ضریب تبیین پیش‌بینی شده (R ² -predicted)		۰/۹۸۸۰			
ضریب تغییرات (درصد)		۱/۱۴			

* WPC: پروتئین کنسانتره آب‌پنیر؛ GA: صمغ عربی؛ Sonic: اولتراسوند (فراصوت)

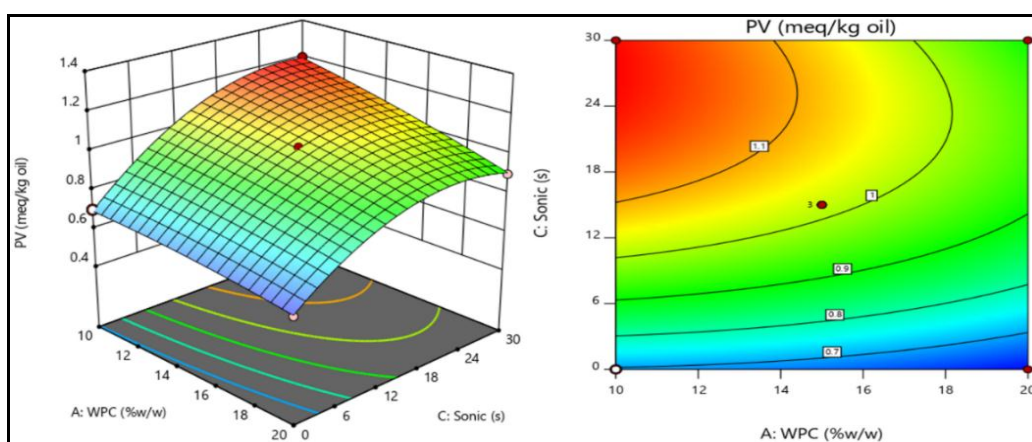


شکل ۱- شکل سه بعدی و کنتور پلات اثر صمغ عربی و پروتئین غلیظ شده آب‌پنیر بر مقدار پراکسید

به ایجاد گرمای نقطه‌ای بر اثر امواج اولتراسوند نسبت داده شود که باعث افزایش واکنش‌های اکسیداسیون شده‌اند (Chemat & Khan, 2011).

اثر متقابل پروتئین-اولتراسوند در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار به دست آمده است که در واقع با افزایش مدت زمان اولتراسوند و کاهش غلظت پروتئین مقدار پراکسید بیشتر شده است.

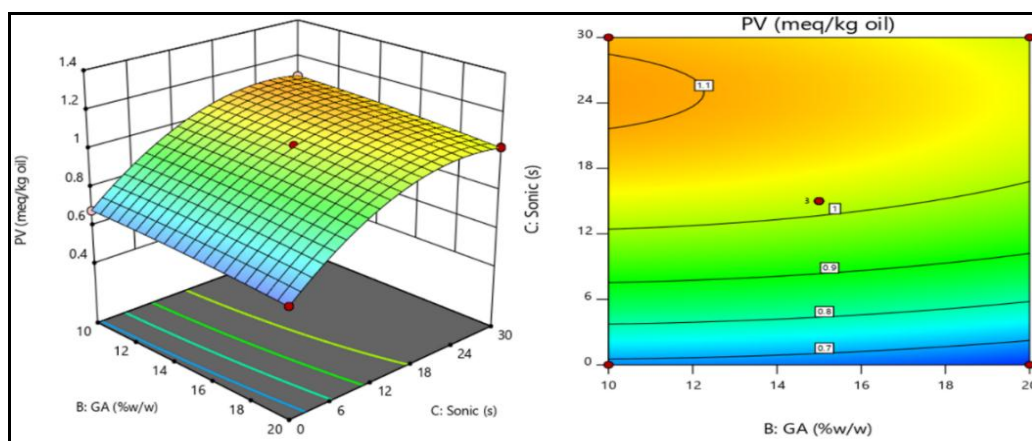
شکل (۲)، اثر پروتئین و تیمار اولتراسوند بر عدد پراکسید را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشخص است، اثر خطی و مربع تیمار اولتراسوند بر مقدار پراکسید به دست آمده در سطح اطمینان ۹۵ درصد معنی‌دار شده است ($p < 0.05$). در واقع، اعمال اولتراسوند باعث شده است که در لحظه آنی اندازه‌گیری پراکسید، مقادیر مربوط هم به صورت خطی و هم به صورت مربع افزایش پیدا کنند که می‌تواند



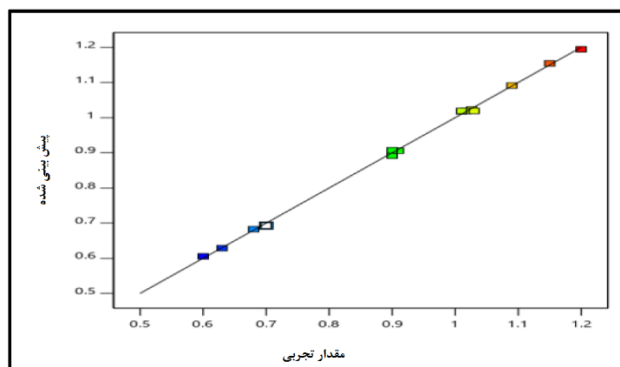
شکل ۲- شکل سه بعدی و کنتور پلات اثر پروتئین غلیظ شده آب پنیر و تیمار اولتراسوند (فراصوت) بر مقدار پراکسید

شده (R^2 -Adj) ۹۹/۶۹ درصد است. در واقع مدل مربع به دست آمده با ضریب تبیین بالا، می‌تواند برای سنجش مقدار پراکسید با در نظر داشتن متغیرهای مستقل به کار رود.

اثر متقابل صمغ-اولتراسوند طبق شکل (۳) معنی‌دار نیست ($p < 0.05$). شکل (۴)، مقادیر پیش‌بینی شده و به دست آمده را نشان می‌دهد که بیانگر اختلاف ناچیز R^2 پیش‌بینی شده (۹۸/۸۰ درصد) و ضریب تبیین تعدیل



شکل ۳- شکل سه بعدی و کنتور پلات اثر صمغ عربی و تیمار اولتراسوند (فراصوت) بر مقدار پراکسید



شکل ۴- مقادیر پیش بینی شده در مقابل مقادیر تجربی به دست آمده

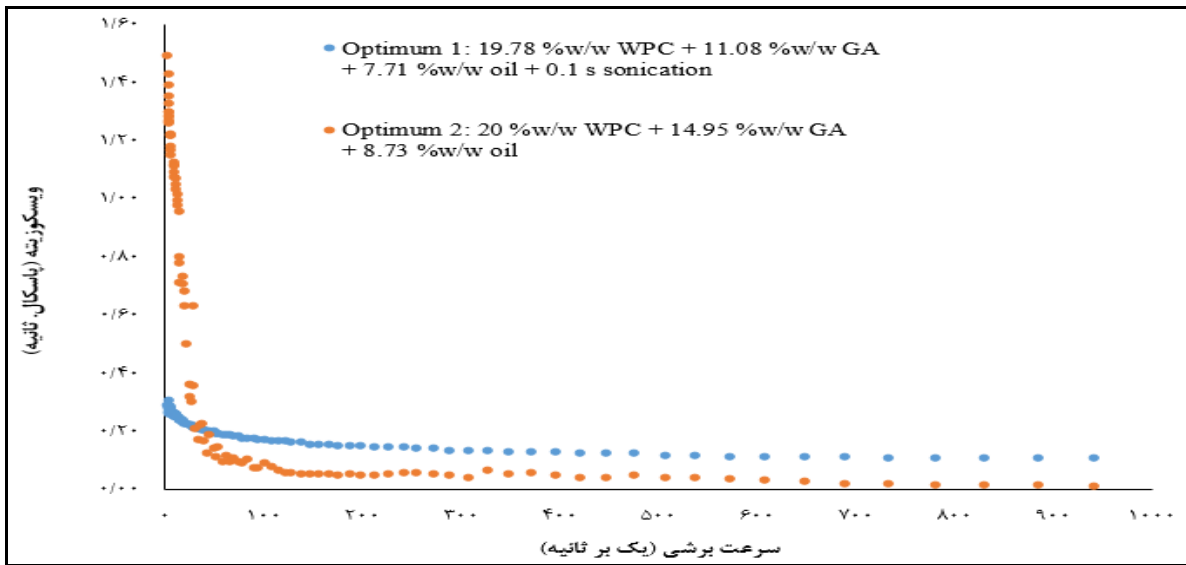
(۰/۲۹ پاسکال.ثانیه) نشان داده است؛ در بهینه ۲، مقدار گرانیوی ۱/۴۹ اندازه‌گیری شده است (Comunian & Favaro-Trindade, 2016). در واقع، صمغ عربی با ساختار بزرگ خود و غلیظ کردن فاز پیوسته می‌تواند باعث افزایش گرانیوی شود. وجود پروتئین در مقادیر بالا باعث می‌شود که مقدار گرانیوی کاهش پیدا کند. این موضوع می‌تواند به خصوصیات ذاتی کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها نسبت داده شود که کربوهیدرات‌ها به دلیل ساختارهای خود، بیشتر می‌توانند برای غلیظ کردن سامانه‌ها استفاده شوند و پروتئین‌ها به‌عنوان عوامل امولسیفایری عمل می‌کنند (Fathi et al., 2014). با وجود این، صمغ عربی به دلیل داشتن یک جز پروتئینی در ساختار خود، علاوه بر اینکه می‌تواند باعث افزایش گرانیوی فاز پیوسته شود، در تشکیل امولسیون نیز شرکت می‌کند و باعث کاهش کشش سطحی در مرز مشترک بین دو فاز می‌شود. ولی بررسی‌ها نتایج حاصل از کشش سطحی نشان می‌دهد پروتئین کنسانتره آب‌پنیر کشش سطحی پایین‌تری ایجاد می‌کند که می‌تواند به بخش‌های هیدروفوب اجزای پروتئینی پروتئین آب‌پنیر (بتالاکتوگلوبولین، کازئین‌ها) مربوط باشد. به‌علاوه، اثبات شده است که وجود پروتئین کنسانتره، باعث می‌شود تا سیال خصوصیت سودوپلاستیک و رقیق شونده با برش نشان دهد (Carneiro et al., 2013). بالا رفتن درصد صمغ و پروتئین و به‌دنبال آن بالا رفتن مقدار روغن و کم شدن مقدار آب باعث غلیظ شدن امولسیون می‌شود.

بهینه‌سازی سطح پاسخ و تأیید نقطه به دست آمده به‌صورت تجربی

بهینه‌سازی بر اساس حداقل مقدار پراکسید انجام شد. بر این اساس، این نقطه برابر با ۱۹/۷۸ پروتئین، ۱۱/۰۸ صمغ عربی و زمان اولتراسوند ۰/۱ ثانیه بود که به‌صورت پیش‌بینی شده با نرم‌افزار به دست آمد. مقدار پراکسید در این نقطه، ۰/۵۹ اکی‌والان بر کیلوگرم روغن بود. به‌منظور حصول اطمینان از نقطه به دست آمده، آنالیز مورد نظر در ۳ تکرار به‌صورت تجربی در آزمایشگاه دنبال شد؛ مقدار به دست آمده برابر با 0.59 ± 0.03 اختلاف معنی‌داری با مقدار پیش‌بینی شده نشان نمی‌دهد ($p > 0.05$).

بررسی خصوصیات رئولوژیکی امولسیون

روند تغییرات گرانیوی در گستره سرعت برشی ۰ تا ۱۰۰۰ دور در ثانیه در شکل (۵) نمایش داده شده است. خصوصیت رئولوژیکی مواد غذایی در مراحل تولید و فرآوری و نیز در مراحل نگهداری بااهمیت است و تحت تأثیری عواملی از جمله اجزای فرمولاسیون، دما، برهمکنش بین اجزا و غیره خواهد بود. از بین نمونه‌های بهینه به‌دست آمده در این مطالعه، دو نمونه با ترکیبات مختلف انتخاب شدند و اثر اجزا و برهمکنش احتمالی بین آنها بررسی شد. طبق شکل (۵) و جدول (۲)، افزایش ماده جامد، باعث افزایش مقدار گرانیوی شده است که نشانگر مقدار بالای نیروی مورد نیاز برای اعمال برش است. نمونه بهینه ۱ به دلیل دارا بودن مقدار پایین صمغ‌عربی، گرانیوی پایین‌تری



شکل ۵- بررسی تغییرات گرانیوی برای دو نمونه بهینه در سرعت‌های برشی ۰ تا ۱۰۰۰ بر ثانیه (γ^{-1}) در دمای ۲۵ درجه سلسیوس

ساختار پروتئینی و افزایش برهمکنش‌های پروتئین-پروتئین می‌شود که می‌تواند به ناپایداری فازی و فلوکوله شدن قطره‌ها بینجامد (Adjonu *et al.*, 2014; Carneiro *et al.*, 2013; Ozturk *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016). دلیل دیگر ناپایداری می‌تواند مقادیر اضافی و جذب نشده صمغ عربی و پروتئین در مرز مشترک بین دو فاز باشد که باعث می‌شود تا مواد با هم کمپلکس تشکیل دهند بی‌آنکه کشش سطحی را پایین آورند و باعث پراکندگی قطره‌های روغن در فاز پیوسته شوند (Khalesi *et al.*, 2016; McClements & Rao, 2011). در واقع، در این شرایط به دلیل بالا بودن مقدار مواد جامد و همچنین با در نظر گرفتن روابط مولکولی ترکیبات پلیمری باهم، پدیده فلوکولاسیون تهی شده^۲ رخ می‌دهد که در آن امولسیفایرها از مرز مشترک بین دو فاز خارج می‌شوند و در نتیجه قطره‌های روغن نیز به صورت ناپایدار درمی‌آیند و از حالت پراکنده خارج می‌شوند. به علاوه، نگهداری امولسیون‌ها در دمای ۴ درجه سلسیوس منجر به تسریع دو فاز شدن و گرمی شدن امولسیون شده‌است که می‌تواند به بلوری شدن جزئی چربی نسبت داده شود که باعث ناپایداری و بروز پدیده استوالد رایپنینگ^۳ می‌شود (Charoen *et al.*,

اثر اولتراسوند، به دلیل کم بودن مدت زمان در نمونه ۱، معنی‌دار نیست.

بررسی پایداری امولسیون

مقادیر پایداری امولسیون محاسبه شده برای نمونه‌های بهینه، نمونه ۷، ۱۲ و نقطه مرکزی در جدول (۴) ارائه داده شده است. پیشتر اشاره شد که صمغ عربی یک عامل غلیظ کننده است که معمولاً در سامانه‌های امولسیونی برای پایدار کردن فاز پراکنده در فاز پیوسته به کار می‌رود و در واقع با ساختار فضایی خود، مانع از به هم پیوستن (فلوکولاسیون) قطره‌های روغن پراکنده شده می‌شود و در نتیجه باعث پایداری طولانی مدت می‌گردد (Klein *et al.*, 2010; Ozturk *et al.*, 2014, Ozturk *et al.*, 2015). پروتئین‌ها با اینکه خواص امولسیفایری بالایی دارند، به دلیل برهمکنش‌های بین زنجیره‌ای و با بخشی از صمغ در فاز پیوسته، کمپلکس‌های ضعیفی تشکیل می‌دهند که می‌توانند باعث ناپایداری فازی شوند. در واقع، برهمکنش‌های بین مولکولی و الکترواستاتیک و تشکیل پیوندهای دی سولفیدی (-S-S-) از طریق کشیده شدن پروتئین‌ها به مرز مشترک بین دو فاز روغن-آب با اعمال سرعت برشی بالا (۱۸۰۰۰ دور بر دقیقه)، باعث باز شدن^۱

1- Unfolding
3- Ostwald ripening

2- Depleted flocculation

کاهش انرژی آزاد بین سطحی می‌شوند و در نتیجه از کووالانس شدن و تجمع ذرات کلوئیدی جلوگیری می‌کنند. بین نمونه‌های انتخاب شده، نمونه ۷ بالاترین مقدار کشش سطحی (۴۷/۰۹ میلی نیوتن بر متر) را داشته که می‌تواند به مقدار پایین پروتئین (۱۰ درصد) مربوط باشد (Aghbashlo *et al.*, 2012; Klein *et al.*, 2010).

اندازه قطره‌ها و پتانسیل زتا

اندازه قطره‌ها و پتانسیل زتای امولسیون نمونه بهینه، یک نمونه از نقطه مرکز (۱۵ درصد پروتئین، ۱۵ درصد صمغ و ۱۵ ثانیه اولتراسوند)، تیمار ۱۲ (۱۵ درصد پروتئین، ۲۰ درصد صمغ عربی، ۳۰ ثانیه اولتراسوند)، و تیمار ۷ (پروتئین ۱۰ درصد، صمغ ۱۵ درصد و اولتراسوند ۳۰ ثانیه) با هدف بررسی اثر ترکیبات بیوپلیمری و مدت زمان اولتراسوند بر فاکتورهای اشاره شده انتخاب و نتایج آن در جدول (۴) ارائه داده شده است. نمونه بهینه با ترکیب ۱۹/۷۸ درصد پروتئین، ۱۱/۰۸ درصد صمغ و ۰/۱ ثانیه زمان اولتراسوند، دارای میانگین اندازه ذرات ۹۱۶/۳ نانومتر و توزیع چندگانه (PDI) ۰/۳ است. نقطه مرکزی دارای میانگین اندازه قطر امولسیونی ۷۴۶ نانومتر با توزیع چندگانه ۰/۲۶ است. تیمار ۱۲ قطر میانگین ۶۰۰ نانومتر و توزیع چندگانه ۰/۲ را نشان داده است. تیمار ۷ دارای قطر میانگین ۶۷۵ نانومتر و شاخص توزیع چندگانه ۰/۲۴ است. این نتایج نشان می‌دهد که افزایش مدت زمان اولتراسوند از صفر تا ۱۵ و ۳۰ ثانیه به صورت معنی‌داری باعث کاهش قطر قطره‌های امولسیونی می‌شود که می‌تواند ناشی از شکسته شدن ساختارهای بیوپلیمری و ریز شدن مولکول‌های روغن باشد.

اِعمال اولتراسوند باعث کاهش شاخص توزیع چندگانه می‌شود که می‌تواند ناشی از پراکنده شدن کمپلکس‌های تشکیل شده باشد. پروتئین‌ها به دلیل خواص کشش سطحی که دارند، باعث ریزتر کردن قطره‌های امولسیونی می‌شوند (Ozturk *et al.*, 2015). به همین دلیل نمونه ۱۲

(2011; McClements & Rao, 2011). نمونه‌های مورد بررسی (نمونه بهینه، نمونه مرکزی و نمونه‌های ۷ و ۱۲) طی ۴۸ ساعت پایدار بودند اما بعد از این مدت زمان، ناپایداری فازی آنها مشاهده شد (به استثنای نمونه ۷). مقدار دو فاز شدن برای نمونه بهینه بیشتر بود که می‌تواند در ارتباط با اندازه قطره‌های امولسیونی آن باشد (۹۱۶ نانومتر) که در مقایسه با نمونه‌های دیگر، قطره‌هایی درشت‌تر در این امولسیون تولید شده بود (جدول ۴). نمونه ۷ تا ده روز پایدار بود و بعد از این مدت زمان به بعد دو فاز شدن آن اتفاق افتاد. این موضوع می‌تواند به فرمولاسیون امولسیون‌ها ارتباط داده شود که در این نمونه ۲۵ درصد ماده جامد بود و ۶/۲۵ درصد روغن به کار رفته بود در حالی که در نمونه‌های دیگر درصد ماده جامد و روغن بالا بود. بالا بودن درصد ماده خشک، باعث غلیظ شدن بیشتر امولسیون می‌شود و در نتیجه صمغ عربی و پروتئین در اثر فلوکولاسیون تهی شده از مرز مشترک بین دو فاز (روغن و آب) خارج می‌شوند و در نتیجه امولسیون ناپایدار می‌شود (Charoen *et al.*, 2011; Comunian & Favaro-Trindade, 2016; Kiokias *et al.*, 2017; Pourashouri *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2016).

بررسی کشش سطحی امولسیون‌ها

در جدول (۴) که مقادیر کشش سطحی ارائه شده‌اند می‌بینیم بین چهار نمونه اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($p < 0.05$). کشش سطحی نمونه بهینه، نسبت به دیگر نمونه‌ها پایین‌تر (۴۲/۴۲ میلی نیوتن بر متر) است. در واقع، مقدار بالای پروتئین در این نمونه (۱۹/۷۸ درصد) و ۱۱/۰۸ درصد صمغ عربی باعث شده است که کشش سطحی کاهش پیدا کند. با توجه به مطالعات پیشین، پروتئین غلیظ شده آب‌پنیر بیشتر از صمغ عربی می‌تواند کشش سطحی را پایین آورد (Khalesi *et al.*, 2016; Klein *et al.*, 2010). در واقع، مواد فعال سطحی مانعی مکانیکی در مرز مشترک بین دو فاز ایجاد می‌کنند و باعث

قطر میانگین پایین تری دارد که می‌تواند هم به فرمولاسیون امولسیون (دارا بودن ۱۵ درصد پروتئین و ۲۰ درصد صمغ) و هم اعمال اولتراسوند مربوط باشد. پتانسیل زتا نمونه‌ها با هم اختلاف معنی‌داری نشان نداده‌اند. مقدار به دست آمده برای نمونه تقریباً ۴۸- میلی‌ولت است. pH نمونه‌های مورد بررسی، زمان تولید، ۵/۴۵ بود که در این نقطه، صمغ عربی دارای بار منفی، پروتئین دارای بار منفی و جزئی مثبت است زیرا نزدیک pH ایزوالکتریک آن است (Klein *et al.*, 2010). این مقدار منفی بودن برای همه امولسیون‌ها را می‌توان به وجود مقدار بالای صمغ عربی نسبت داد که اوزتورک و همکاران

قطر میانگین پایین تری دارد که می‌تواند هم به فرمولاسیون امولسیون (دارا بودن ۱۵ درصد پروتئین و ۲۰ درصد صمغ) و هم اعمال اولتراسوند مربوط باشد. پتانسیل زتا نمونه‌ها با هم اختلاف معنی‌داری نشان نداده‌اند. مقدار به دست آمده برای نمونه تقریباً ۴۸- میلی‌ولت است. pH نمونه‌های مورد بررسی، زمان تولید، ۵/۴۵ بود که در این نقطه، صمغ عربی دارای بار منفی، پروتئین دارای بار منفی و جزئی مثبت است زیرا نزدیک pH ایزوالکتریک آن است (Klein *et al.*, 2010). این مقدار منفی بودن برای همه امولسیون‌ها را می‌توان به وجود مقدار بالای صمغ عربی نسبت داد که اوزتورک و همکاران

جدول ۴- خصوصیات امولسیونی اندازه قطره، شاخص توزیع، پتانسیل زتا، کشش سطحی و پایداری فازی

نمونه	میانگین اندازه قطره‌ها (نانومتر)	PDI	پتانسیل زتا (میلی ولت)	کشش سطحی (میلی نیوتن بر متر)	جدا شدن فازی (درصد)
نمونه بهینه	۹۱۶±۶۳/۱ ^a	۰/۳±۰/۰۲۵ ^a	-۴۸/۴±۰/۳۵ ^d	۴۲/۴۲±۰/۳ ^d	۴۳/۵۰±۰/۵۰ ^a
نقطه مرکزی	۷۴۶±۴۵ ^b	۰/۲۶±۰/۰۲ ^b	-۴۸/۴۵±۰/۴۵ ^a	۴۴/۳۷±۰/۲ ^b	۳۸/۴۰±۰/۳۵ ^b
نمونه ۷	۶۷۵±۳۰ ^b	۰/۲۴±۰/۰۱ ^b	-۴۸/۵۰±۵۰ ^a	۴۷/۰۹±۰/۱۵ ^a	۳۰/۴۵±۰/۶۰ ^d
نمونه ۱۲	۶۰۰±۲۰ ^c	۰/۲±۰/۰۲ ^c	-۴۸/۶۰±۰/۴۸ ^a	۴۳/۲۰±۰/۲۵ ^c	۳۵/۶۰±۰/۴ ^c

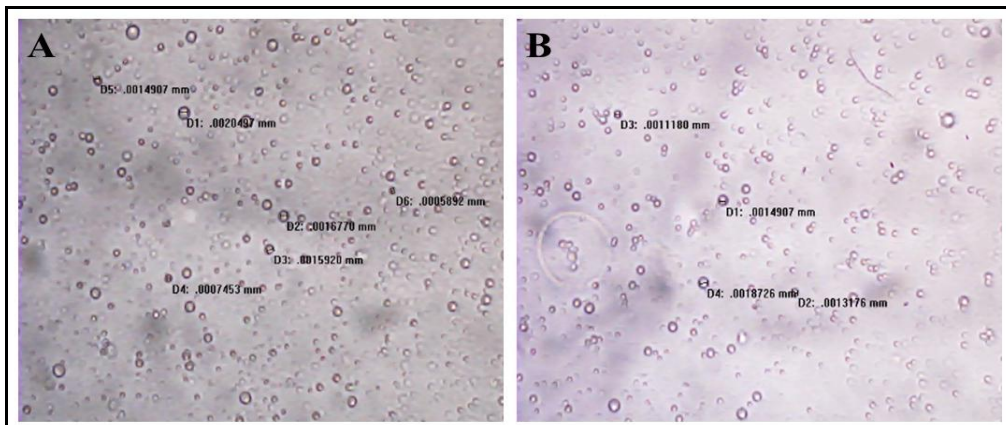
فاز منتقل کند و باعث شکسته شدن گلبول‌های چربی به قطره‌های کوچک‌تر شود (Ozturk *et al.*, 2015). نمونه ۱۲ با میکروسکوپ نوری نیز بررسی شد. تصویر به دست آمده شبیه نمونه بهینه با اعمال اولتراسوند بود. اندازه قطره‌ها در گستره ۵۰۰ تا ۱۸۰۰ نانومتر به دست آمدند.

پایداری اکسیداتیو روغن ریزپوشانی شده

اندازه‌گیری آنی پراکسید بعد از تولید امولسیون‌ها، نمی‌تواند بیانگر خوب پایداری اکسیداتیو باشد، چون در لحظه اندازه‌گیری آنی شرایط تشدید کننده اکسیداسیون برقرار نیست و نیاز است تا در مدت زمانی مشخص (۲۸ روز) در شرایط اکسیداسیونی ویژه (دمای ۵۰ درجه سلسیوس) اندازه‌ها گرفته شوند. طبق شکل (۷)، پنج‌نمونه برای مشخص کردن اثر متغیرها در نظر گرفته شده است.

بررسی چشمی امولسیون

بررسی ظاهری و چشمی امولسیون بهینه با میکروسکوپ نوری نشان داد که اندازه قطره‌ها در حدود ۵۰۰ تا ۲۰۰۰ نانومتر متغیر است که در واقع می‌تواند درست یا نادرست بودن نتیجه به دست آمده از طریق DLS را تأیید کند (شکل ۶). مقدار بالای پروتئین کنسانتره آب‌پنیر و اعمال ۱۸۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۵ دقیقه برای تشکیل امولسیون با اولتراتوراکس، می‌تواند عامل اصلی در ریز کردن قطره‌ها باشد (Komaiko *et al.*, 2016)؛ در واقع، پروتئین آب‌پنیر به دلیل پتانسیل بالای کاهش در مقدار کشش سطحی، می‌تواند مقدار روغن بیشتری را در مرز مشترک بین دو فاز دخیل کند و در زمان تشکیل امولسیون، مقدار بیشتری روغن را در مرز مشترک بین دو

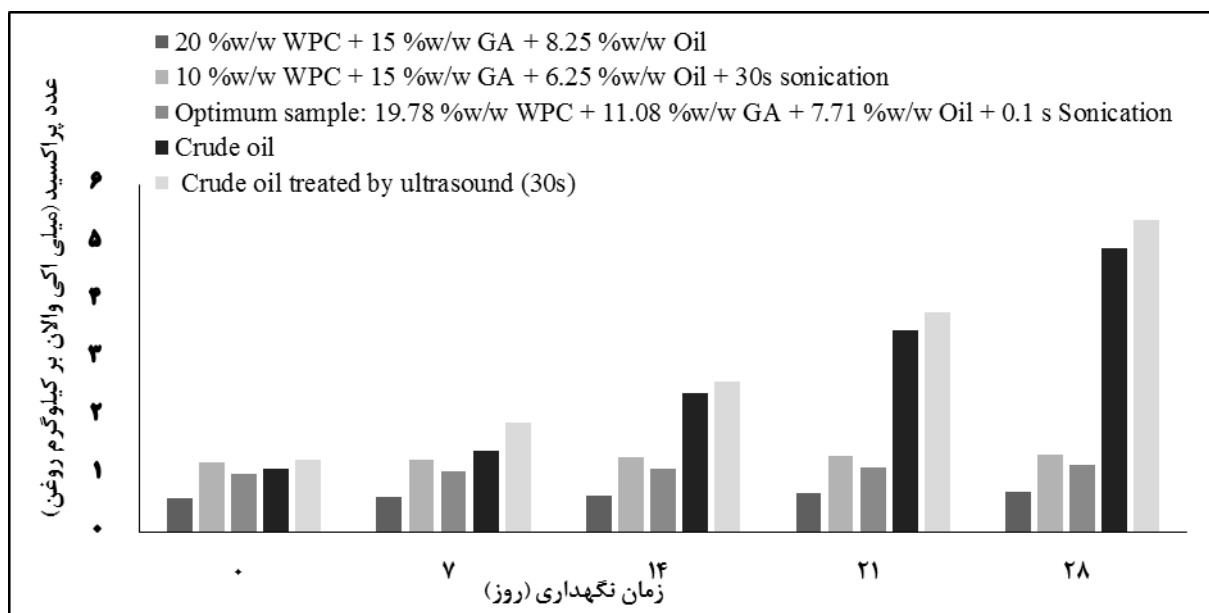


شکل ۶- تصاویرهای به دست آمده از بررسی نمونه‌ها زیر میکروسکوپ نوری: نمونه بهینه (A) و نمونه ۱۲ (B).
مقادیر روی شکل اندازه قطره‌های امولسیون بر اساس میلی‌متر است

ارتباط با کمتر بودن مقدار صمغ عربی، نسبت به نمونه ۶، و مدت زمان اولتراسوند کمتر، نسبت به نمونه ۷، باشد. در واقع، خود صمغ عربی که پوشش فیزیکی است می‌تواند مانع از جدا شدن روغن از کمپلکس ترکیبات بیوپلیمری شود (Charoen *et al.*, 2011; Fernandes *et al.*, 2014; Premi & Sharma, 2017; Rajabi *et al.*, 2015; Timilsena *et al.*, 2017). در مقابل، نمونه‌های آزاد روغن با و بدون تیمار اولتراسوند مقادیر پراکسید بالاتری نسبت به نمونه‌های امولسیونی نشان داده‌اند که دلیل آن می‌تواند مرتبط باشد به فقدان پوشش و اثر یک عامل خارجی (تیمار اولتراسوند) که باعث تولید رادیکال‌های آزاد و در نتیجه باعث توسعه و پیشرفت واکنش‌های اکسیداسیونی می‌شود (Chemat & Khan, 2011; Choe & Min, 2006).

موضوع بااهمیت دیگر اعمال اولتراسوند است که ثابت شده می‌تواند با شکستن ساختارهای مولکولی پروتئین، پپتیدهایی تولید کند که خواص آنتی‌اکسیدانی بالقوه‌ای دارند و می‌توانند از اکسیداسیون روغن در طولانی‌مدت جلوگیری کنند (Adjonu *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2011; Choe & Min, 2006; Drusch *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2013; Madadlou *et al.*, 2010; O'Sullivan *et al.*, 2014; O'Sullivan *et al.*, 2016; Timilsena *et al.*, 2017; Waraho *et al.*, 2011).

دو نمونه روغن به صورت آزاد (با تیمار اولتراسوند به مدت ۳۰ ثانیه و بدون تیمار) و سه نمونه به صورت امولسیون (نمونه بهینه، نمونه شماره ۶ و ۷) بررسی شدند. بررسی پراکسید در نمونه ۶ نشانگر تغییر ۰/۶ تا ۰/۶۹ اکی‌والان بر کیلوگرم طی ۲۸ روز است. نمونه ۷، نسبت به نمونه قبلی، دارای مقادیر پراکسید بالاتری است (تغییر ۱/۲ به ۱/۳۵ اکی‌والان بر کیلوگرم روغن) که می‌تواند به اعمال اولتراسوند مربوط باشد که باعث برقراری افزایش دمای نقطه‌ای می‌شود و در نتیجه افزایش دما، اکسیداسیون شدت می‌گیرد (Chemat & Khan, 2011). البته درصد پروتئین نیز در نمونه ۷ کمتر است تا در نمونه ۶ که می‌تواند قدرت آنتی‌اکسیدانی بالای نمونه ۶ را به دلیل حضور پروتئین غلیظ شده آب‌پنیر نشان دهد (Adjonu *et al.*, 2011; Matalanis *et al.*, 2014). با این همه، مقدار روغن در نمونه ۶ بیشتر بوده است که خود می‌تواند عامل ناپایداری فازی باشد و در نتیجه آن، روغن از امولسیون جدا می‌شود که در این شرایط به راحتی در معرض اکسیژن قرار می‌گیرد. اما پتانسیل بالای آنتی‌اکسیدانی نمونه ۶، مشخصاً باعث حفظ بهتر روغن شده است (Eratte *et al.*, 2015). نمونه بهینه به دست آمده، مقدار پراکسید بالاتری نسبت به نمونه ۶ و کمتر از نمونه ۷ دارد که می‌تواند در



شکل ۷- بررسی پایداری اکسیداتیو امولسیون‌های روغن در آب، روغن خالص و روغن تیمار شده با فراصوت در شرایط اکسیداسیونی ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۸ روز

شونده با برش از خود نشان دادند که بیشتر می‌تواند به اثر پروتئین مربوط باشد. نتایج نشان داد که اعمال اولتراسوند اندازه قطره‌های امولسیون را کم می‌کند به طوری که نمونه ۱۲ دارای اندازه ۶۰۰ نانومتر اما نمونه بهینه دارای اندازه ۹۱۶ نانومتر است. کشش سطحی نمونه بهینه ۴۲/۴۲ میلی نیوتن بر متر به دست آمده است که می‌تواند به مقدار بالای پروتئین آن نسبت داده شود. تصویرهای میکروسکوپ نوری هم از نظر اندازه قطره‌ها، مطابقت خوبی با نتایج DLS نشان داده است. به علاوه، نتایج تحقیق حاکی از این است که امولسیون بهینه و نمونه‌هایی که از بین ۲۰ تیمار انتخاب شدند (۷، ۱۲ و نقطه مرکزی)، طی ۴۸ ساعت پایدار (فازی) بودند (به استثنای نمونه ۷ که تا ۱۰ روز پایدار بود) ولی با افزایش درصد پروتئین، جدا شدن فازی بیشتر شد. استفاده از پروتئین در کنار صمغ عربی، پایداری اکسیداسیونی روغن را به صورت چشمگیری افزایش داده است که به خاصیت آنتی‌اکسیدانی اجزای آن یعنی بتالاکتوگلوبولین نسبت داده می‌شود.

نتیجه‌گیری

هدف این مطالعه، تولید امولسیون روغن خاکشیر و بررسی پایداری اکسیداتیو آن است. در پژوهش حاضر، ۳ متغیر مستقل غلظت‌های صمغ عربی (۲۰-۱۰ درصد وزنی/وزنی) و پروتئین غلیظ شده آب پنیر (۲۰-۱۰ درصد وزنی/وزنی) و مدت زمان اولتراسوند (۳۰-۰ ثانیه) با یک متغیر وابسته شاخص پراکسید (میلی‌اکی‌والان بر کیلوگرم روغن)، در نظر گرفته شدند و با استفاده از بهینه سازی سطح پاسخ و طرح باکس بنکن، آزمایش‌ها اجرا شد و نقطه بهینه به دست آمد. نقطه بهینه، ۱۹/۷۸ درصد وزنی/وزنی پروتئین و ۱۱/۰۸ درصد وزنی/وزنی صمغ با مدت زمان ۰/۱ ثانیه تیمار اولتراسوند بود که مقدار شاخص پراکسید بر این اساس، ۰/۵۹ میلی‌اکی‌والان بر کیلوگرم روغن به دست آمد. خصوصیات امولسیون از قبیل گرانیروی، پایداری امولسیونی، اندازه قطره‌ها و پتانسیل زتا، مشاهده چشمی قطره‌ها، کشش سطحی و پایداری اکسیداتیو روغن به تله افتاده بررسی شدند. امولسیون‌های بهینه، خصوصیت رقیق

مراجع

- Adjonu, R., Doran, G., Torley, P. and Agboola, S. 2014. Whey protein peptides as components of nanoemulsions: A review of emulsifying and biological functionalities. *Journal of Food Engineering* 122, 15-27.
- Aghbashlo, M., Mobli, H., Madadlou, A. and Rafiee, S. 2012. The correlation of wall material composition with flow characteristics and encapsulation behavior of fish oil emulsion. *Food Research International* 49(1): 379-388.
- Anwar, S.H. and 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(2): 367-378.
- Bae, E. and Lee, S. 2008. Microencapsulation of avocado oil by spray drying using whey protein and maltodextrin. *Journal of Microencapsulation*. 25(8): 549-560.
- Bai, L., Huan, S., Li, Z. and McClements, D.J. 2017. Comparison of emulsifying properties of food-grade polysaccharides in oil-in-water emulsions: Gum arabic, beet pectin, and corn fiber gum. *Food Hydrocolloids*. 66, 144-153.
- Bakry, A.M., Abbas, S., Ali, B., Majeed, H., Abouelwafa, M.Y., Mousa, A. and Liang, L. 2016. Microencapsulation of oils: A comprehensive review of benefits, techniques, and applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 15(1): 143-182.
- Bekker, N., Ul'chenko, N. and Glushenkova, A. 2005. Lipids from *descurainia sophia* seeds. *Chemistry of Natural Compounds*. 41(3): 346-347.
- Carneiro, H.C., Tonon, R.V., Grosso, C.R. and 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.
- Charoen, R., Jangchud, A., Jangchud, K., Harnsilawat, T., Naivikul, O. and McClements, D.J. 2011. Influence of biopolymer emulsifier type on formation and stability of rice bran oil-in-water emulsions: whey protein, gum arabic, and modified starch. *Journal of Food Science*. 76 (1): E165-E172.
- Chemat, F. and Khan, M.K. 2011. Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*. 18(4): 813-835.
- Chen, L., Chen, J.S., Ren, J.Y. and Zhao, M.M. 2011. Effects of ultrasound pretreatment on the enzymatic hydrolysis of soy protein isolates and on the emulsifying properties of hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59(6): 2600-2609.
- Choe, E. and Min, D.B. 2006. Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 5(4): 169-186.
- Comunian, T.A. and Favaro-Trindade, C.S. 2016. Microencapsulation using biopolymers as an alternative to produce food enhanced with phytosterols and omega-3 fatty acids: A review. *Food Hydrocolloids*. 61, 442-457.
- Darbasi, M., Askari, G., Kiani, H. and Khodaiyan, F. 2017. Development of chitosan based extended-release antioxidant films by control of fabrication variables. *International Journal of Biological Macromolecules*. 104, 303-310 .
- Drusch, S., Serfert, Y., Scampicchio, M., Schmidt-Hansberg, B. and 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.
- Dunford, N. 2015. Hemp and flaxseed oil: Properties and applications for use in food. *Specialty Oils and Fats in Food and Nutrition: Properties, Processing and Applications*. 39-63.
- Eratte, D., McKnight, S., Gengenbach, T.R., Dowling, K., Barrow, C.J. and Adhikari, B.P. 2015. Co-encapsulation and characterisation of omega-3 fatty acids and probiotic bacteria in whey protein isolate-gum Arabic complex coacervates. *Journal of Functional Foods*. 19, 882-892.
- Esfanjani, A.F., Jafari, S.M. and Assadpour, E. 2017. Preparation of a multiple emulsion based on pectin-whey protein complex for encapsulation of saffron extract nanodroplets. *Food Chemistry*. 221, 1962-1969.
- Fathi, M., Martín, Á. and McClements, D.J. 2014. Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems. *Trends in Food Science & Technology*. 39(1): 18-39.

- Fernandes, R.V.D., Borges, S.V. and Botrel, D.A. 2014. Gum arabic starch maltodextrin/inulin as wall materials on the microencapsulation of rosemary essential oil. *Carbohydrate Polymers*. 101, 524-532.
- Frascareli, E., Silva, V., Tonon, R. and Hubinger, M. 2012. Effect of process conditions on the microencapsulation of coffee oil by spray drying. *Food and Bioproducts Processing*. 90(3): 413-424 .
- Gallardo, G., Guida, L., Martinez, V., López, M.C., Bernhardt, D., Blasco, R., Pedroza-Islas, R. and Hermida, L.G. 2013. Microencapsulation of linseed oil by spray drying for functional food application. *Food Research International*. 52(2): 473-482.
- Ghorbanzade, T., Jafari, S.M., Akhavan, S. and Hadavi, R. 2017. Nano-encapsulation of fish oil in nano-liposomes and its application in fortification of yogurt. *Food Chemistry*. 216, 146-152.
- Gong, J.-H., Zhang, Y.-L., He, J.-L., Zheng, X.-K., Feng, W.-S., Wang, X.-L., Kuang, H.-X., Li, C.-G. and Cao, Y.-G. 2015. Extractions of oil from *Descurainia sophia* seed using supercritical CO₂, chemical compositions by GC-MS and evaluation of the anti-tussive, expectorant and anti-asthmatic activities. *Molecules*. 20(7): 13296-13312.
- Guo, J., Zhou, Q., Liu, Y.C., Yang, X.Q., Wang, J.M., Yin, S.W. and Qi, J.R. 2016. Preparation of soy protein-based microgel particles using a hydrogel homogenizing strategy and their interfacial properties. *Food Hydrocolloids*. 58, 324-334.
- Hu, H., Wu, J.H., Li-Chan, E.C.Y., Zhu, L., Zhang, F., Xu, X.Y., Fan, G., Wang, L.F., Huang, X.J. and Pan, S.Y. 2013. Effects of ultrasound on structural and physical properties of soy protein isolate (SPI) dispersions. *Food Hydrocolloids*. 30(2): 647-655.
- Karaca, A.C., Nickerson, M. and Low, N.H. 2013. Microcapsule production employing chickpea or lentil protein isolates and maltodextrin: Physicochemical properties and oxidative protection of encapsulated flaxseed oil. *Food Chemistry*. 139(1): 448-457.
- Khalesi, H., Emadzadeh, B., Kadkhodaei, R. and Fang, Y. 2016. Whey protein isolate-Persian gum interaction at neutral pH. *Food Hydrocolloids*. 59, 45-49.
- Kiokias, S., Gordon, M.H. and Oreopoulou, V. 2017. Effects of composition and processing variables on the oxidative stability of protein-based and oil-in-water food emulsions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 57(3): 549-558.
- Klein, M., Aserin, A., Ishai, P.B. and Garti, N. 2010. Interactions between whey protein isolate and gum Arabic. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 79(2): 377-383.
- Komaiko, J., Sastrosubroto, A. and McClements, D.J. 2016. Encapsulation of ω -3 fatty acids in nanoemulsion-based delivery systems fabricated from natural emulsifiers: Sunflower phospholipids. *Food Chemistry*. 203, 331-339.
- Lee, Y.J., Kim, N.S., Kim, H., Yi, J.M., Oh, S.M., Bang, O.S. and Lee, J. 2013. Cytotoxic and anti-inflammatory constituents from the seeds of *descurainia sophia*. *Archives of Pharmacal Research*. 36(5): 536-541.
- Leizer, C., Ribnicky, D., Poulev, A., Dushenkov, S. and Raskin, I. 2000. The composition of hemp seed oil and its potential as an important source of nutrition. *Journal of Nutraceuticals, Functional and Medical Foods*. 2(4): 35-53.
- Liang, J., Appukuttan Aachary, A. and Thiyam- Holländer, U. 2015. Hemp seed oil: Minor components and oil quality. *Lipid Technology*. 27(10): 231-233 .
- Madadlou, A., Emam-Djomeh, Z., Mousavi, M.E., Mohamadifar, M. and Ehsani, M. 2010. Acid-induced gelation behavior of sonicated casein solutions. *Ultrasonics Sonochemistry*. 17(1): 153-158.
- Mahdavi, S.A., Jafari, S.M., Assadpoor, E. and Dehnad, D. 2016. Microencapsulation optimization of natural anthocyanins with maltodextrin, gum Arabic and gelatin. *International Journal of Biological Macromolecules*. 85, 379-385.
- Matalanis, A., Jones, O.G. and McClements, D.J. 2011. Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds. *Food Hydrocolloids*. 25(8): 1865-1880.
- McClements, D.J. 2015. Encapsulation, protection, and release of hydrophilic active components: potential and limitations of colloidal delivery systems. *Advances in Colloid and Interface Science*. 219, 27-53.
- McClements, D.J. 2017. Recent progress in hydrogel delivery systems for improving nutraceutical bioavailability. *Food Hydrocolloids*. 68, 238-245.

- McClements, D.J. and Rao, J. 2011. Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 51(4): 285-330.
- O'Sullivan, J., Arellano, M., Pichot, R. and Norton, I. 2014. The effect of ultrasound treatment on the structural, physical and emulsifying properties of dairy proteins. *Food Hydrocolloids*. 42, 386-396.
- O'Sullivan, J., Murray, B., Flynn, C. and Norton, I. 2016. The effect of ultrasound treatment on the structural, physical and emulsifying properties of animal and vegetable proteins. *Food Hydrocolloids* 53, 141-154 .
- Ozturk, B., Argin, S., Ozilgen, M. and McClements, D.J. 2014. Formation and stabilization of nanoemulsion-based vitamin E delivery systems using natural surfactants: Quillaja saponin and lecithin. *Journal of Food Engineering*. 142, 57-63.
- Ozturk, B., Argin, S., Ozilgen, M. and McClements, D.J. 2015. Formation and stabilization of nanoemulsion-based vitamin E delivery systems using natural biopolymers: whey protein isolate and gum arabic. *Food Chemistry*. 188, 256-263.
- Pourashouri, P., Shabanpour, B., Razavi, S.H., Jafari, S.M., Shabani, A. and Aubourg, S.P. 2014. Impact of wall materials on physicochemical properties of microencapsulated fish oil by spray drying. *Food and Bioprocess Technology*. 7(8): 2354-2365.
- Premi, M. and Sharma, H. 2017. Effect of different combinations of maltodextrin, gum arabic and whey protein concentrate on the encapsulation behavior and oxidative stability of spray dried drumstick (*Moringa oleifera*) oil. *International Journal of Biological Macromolecules*. 105, 1232-1240.
- Rajabi, H., Ghorbani, M., Jafari, S.M., Mahoonak, A.S. and 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.
- Sessa, M., Balestrieri, M.L., Ferrari, G., Servillo, L., Castaldo, D., D'Onofrio, N., Donsi, F. and Tsao, R. 2014. Bioavailability of encapsulated resveratrol into nanoemulsion-based delivery systems. *Food Chemistry*. 147, 42-50.
- Shantha, N.C. and DECKER, E.A. 1994. Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. *Journal of AOAC International*. 77(2): 421-424.
- Timilsena, Y.P., Wang, B., Adhikari, R. and Adhikari, B. 2017. Advances in microencapsulation of polyunsaturated fatty acids (PUFAs)-rich plant oils using complex coacervation: A review. *Food Hydrocolloids*. 69, 369-381.
- Tonon, R.V., Grosso, C.R. and Hubinger, M.D. 2011. Influence of emulsion composition and inlet air temperature on the microencapsulation of flaxseed oil by spray drying. *Food Research International*. 44(1): 282-289.
- Vahedifar, A., Madadlou, A. and Salami, M. 2017. Calcium and chitosan-mediated clustering of whey protein particles for tuning their colloidal stability and flow behaviour. *International Dairy Journal*. 73, 136-143.
- Wang, L., Gao, Y., Li, J., Subirade, M., Song, Y. and Liang, L. 2016. Effect of resveratrol or ascorbic acid on the stability of α -tocopherol in O/W emulsions stabilized by whey protein isolate: Simultaneous encapsulation of the vitamin and the protective antioxidant. *Food Chemistry*. 196, 466-474.
- Waraho, T., McClements, D.J. and Decker, E.A. 2011. Mechanisms of lipid oxidation in food dispersions. *Trends in Food Science and Technology*. 22(1): 3-13.

Investigation on Oxidative Stability of O/W Emulsion of *Descurainia Sophia* Seeds Oil, Encapsulated by Gum Arabic and Whey Protein Concentrate and the Effect of Ultra Sound Sonification on Changes in Oxidative Indices

S. Malek, Z. Emam-Djomeh^{*}, Gh. Askari and A. Rezvankhah

^{*} Corresponding author: Transfer Phenomena Laboratory (TPL), Department of Food Science, Technology and Engineering, Faculty of Agricultural Engineering and Technology, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

Email: emamj@ut.ac.ir

Received: 7 May 2018, Accepted: 27 August 2018

This study was aimed to fabricate O/W emulsions of *Descurainia Sophia* seeds oil in order to be stabilized against oxidation. Response surface methodology (RSM) was used to optimizing the process in which the gum Arabic (GA), whey protein concentrate (WPC), and sonication time were selected as independent variables where the peroxide value (meq/kg oil) was considered as a response factor. The optimum point was obtained when the WPC, and GA, and ultrasound treatment time were as 19.78%, 11.08%, and 0.1 s, respectively. In the associated optimum point, peroxide value was determined as 0.59 meq/kg oil. The emulsion oil droplets varied dependently to ultrasound time and WPC concentration which both decreased the oil droplets sizes with more exposing and high concentration inclusion. Conversely, ultrasound applying resulted in higher peroxide values at the instantaneous determinations. The optimum emulsion indicated 916 nm with the -48 mV Zeta potential. The respective sample exhibited shear thinning behavior which more effectively attributed to WPC existence. Oxidation stability of the emulsion samples compared with crude oil and the oil treated with 30 s ultrasound. The results indicated that the GA and WPC effectively preserved the oil during 28 d at the intensifying circumstances (50 °C) and the free oils were oxidized more intensively. GA due to steric repulsion structure forming in the vicinity of oil droplets and WPC due to electrostatic repulsion, produced a complex biopolymer structure which had potentially antioxidant and coating attributes.

Keywords: Antioxidant, O/W emulsion, RSM, Zeta potential