

ریزپوشانی دو کوزاهگزانوئیک اسید (DHA) در زیست کامپوزیت آلترینات، پکتین و ژلاتین و بررسی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی آن

اسماء سادات وزیری، ایران عالم‌زاده*⁺، منوچهر وثوقی

مرکز تحقیقات بیوشیمی و محیط زیست، دانشکده مهندسی شیمی و نفت، دانشگاه صنعتی شریف، صندوق پستی ۱۱۱۵۵-۱۱۳۶۵، تهران، ایران

چکیده: اسید چرب چند غیر اشباعی دو کوزاهگزانوئیک اسید (DHA) از مهم‌ترین اسیدهای چرب غیر اشباع ضروری امگا-۳ با اثرهای سلامت بخش فراوان می‌باشد، که در صنعت غذاهای فراسودمند مورد توجه زیادی قرار گرفته است. وجود پیوند های دوگانه در اسید چرب DHA باعث تخریب اکسایشی شده و به سرعت ایجاد طعم و بوی ناخوشایند کرده و از اثرهای تغذیه ای آن می‌کاهد. هدف از این پژوهش توسعه‌ی یک نوع ریزکپسول است که بتواند اسید چرب DHA را کپسوله کرده و از آن در برابر شرایط نامناسب محافظت کند. نخست، زیست کامپوزیتی تشکیل شده از آلترینات، پکتین و ژلاتین با غلظت‌های معین تهیه شد و کپسول‌ها به روش ژله‌ای شدن یونی کلسیم-آلترینات سنتز شدند. ریخت‌شناسی، بلورینگی، پیوندهای فیزیکی و شیمیایی و آنالیز گرمایی پلیمرها و زیست کامپوزیت دارای DHA به ترتیب با استفاده از روش‌های SEM، XRD، FTIR و TGA مورد بررسی قرار گرفتند. طبق نتیجه‌ها، میکروذره‌های کروی و مسطح تولید شده دارای بازده ریزپوشانی ۷۷٫۷۸٪ و بازده فرایند ۸۸٫۹۷٪ بودند. در مجموع، زیست کامپوزیت اسید چرب DHA سنتز شده با این روش، می‌تواند به عنوان سامانه‌ای نوین در حفظ و نگهداری اسید چرب DHA در صنعت غذاهای فراسودمند مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: دو کوزاهگزانوئیک اسید، ریزپوشانی، سدیم آلترینات، پکتین، ژلاتین

KEYWORDS: DHA fatty acid, Microencapsulation, Sodium alginate, Pectin, Gelatin

مقدمه

خود استفاده نمی‌کنند [۱]. منابع معمول برای این اسید های چرب ضروری ماهی‌ها، روغن‌ها، دانه‌ها و مکمل‌ها هستند. ولی بیش‌تر این منابع شامل مقدار بسیار کمی از دو کوزاهگزانوئیک اسید (DHA)، نوع ویژه‌ای از اسید چرب امگا-۳ که اهمیت ویژه‌ای در درمان بیماری‌های قلبی - شریانی، ذهنی و سلامت شبکه‌ی چشم دارد، می‌باشند [۵ - ۲]. در حال حاضر ماهی و مکمل های آن منبع اصلی

اسیدهای چرب چند غیر اشباعی امگا-۳^(۱) از جمله مهم‌ترین مواد مغذی ضروری برای سلامت انسان هستند که مهم‌ترین آن‌ها شامل اسید چرب دو کوزاهگزانوئیک اسید، ایکوزاپنتانوئیک اسید و آلفالینولیک اسید می‌باشند. بر خلاف بالا رفتن سطح آگاهی عمومی در زمینه اهمیت و ویژگی‌های ثابت شده‌ی اسیدهای چرب امگا-۳، عموم مردم از این اسید های چرب به مقدار کافی در برنامه‌ی غذایی

+E-mail: alemzadeh@sharif.edu

* عهده دار مکاتبات

(۱) ω3 PUFA

در روغن فله‌ای، امولسیون و فراورده‌ها با فعالیت آب متفاوت فرق می‌کند که در طول فرایند تولید و نگهداری، منبع اسید چرب با خیلی از این شرایط متفاوت روبرو می‌شود. همچنین، بسیاری از آنتی‌اکسیدان‌ها مانند توکوفرول^۵ در سطوح بالا مانند پروکسیدان عمل می‌کنند.

ریزپوشانی فرایندی برای احاطه کردن یا تعبیه‌ی هسته درون کامپوزیتی تشکیل شده از پلی‌ساکاریدهای طبیعی یا کربوهیدرات‌ها بوده که از تخریب هسته در برابر شرایط نامساعد محیطی (نور، اکسیژن، گرما و ...) جلوگیری می‌کند. پایداری این ریزکپسول‌ها به ویژگی‌هایی مانند توزیع هسته درون ذره، اندازه ذره، مساحت سطح، دانسیته ذره، رطوبت، فعالیت آب و ترکیب و جنس جداره ذره‌ها (دمای انتقال شیشه، بلورینگی، تراکنش جداره با هسته، تخلخل و ...) دارد. اگر شرایط فرایندی و جنس جداره به درستی انتخاب شوند، ریزکپسول‌هایی با پایداری بالا به دست خواهد آمد [۹]. تاکنون مطالعه‌های زیادی در خصوص ریزپوشانی اسید چرب DHA برای به کارگیری آن‌ها در تولید غذاهای فراسودمند صورت گرفته است. بر اساس مطالعه‌هایی که تاکنون صورت گرفته است ریزپوشانی اسید چرب و روغن امگا-۳ تاکنون با روش هیدروژل آلژینات انجام نشده است. روش‌های گوناگونی برای سنتز دانه‌های هیدروژل آلژینات وجود دارد. این روش‌ها به‌طور گسترده‌ای به دو دسته‌ی جداگانه تقسیم می‌شوند دسته‌ی اول روش‌های مبتنی بر اکستروژن و امولسیون و دسته‌ی دوم روش‌های بر پایه‌ی ژل شدن درون و ژل شدن بیرونی می‌باشند. دو عبارت اول شامل روش‌های تولید دانه‌های هیدروژل آلژینات بوده و دو عبارت بعدی روش برقراری اتصال عرضی این قطره‌ها برای تشکیل هیدروژل می‌باشد. روش اکستروژن از قدیمی‌ترین و متداول‌ترین فرایند تولید میکروکپسول‌های هیدروکلوئیدی می‌باشد. اکستروژن در مورد آلژینات به شرح زیر است: آماده‌سازی محلول هیدروکلوئید، افزودن ماده‌ی هسته به محلول یاد شده به منظور تشکیل امولسیون و اکستروژن محلول به دست آمده با سوزن سرنگ به طوری که قطره‌های ریز را نتیجه می‌دهد که به طور مستقیم و به صورت قطره‌ای و به آرامی به محلول جامدکننده (سخت‌کننده^۶) افزوده می‌شوند. محلول سخت‌کننده شامل کاتیون‌های چندبنیانی است (به طور معمول کلسیم در شکل کلسیم کلرید). پس از چکاندن، پلیمرهای آلژینات فوری دور هسته را فرا می‌گیرند و تشکیل شبکه‌ی سه بعدی همراه با پیوندهای عرضی با یون‌های کلسیم را می‌دهند. ریزپوشانی در ریزکپسول سدیم آلژینات^۷ به تنهایی

مصرف DHA در بین افراد می‌باشند که مزه و بوی نامطبوع آن برای بیش‌تر افراد ناخوشایند بوده و به دلیل منبع حیوانی بودن آن توسط جامعه گیاه‌خواران مصرف نمی‌شود. افزون بر آن ماهی ممکن است آلوده به فلزهای سنگین باشد و اختلاف چشمگیر مصرف را نمی‌توان تنها با منابع دریایی پر کرد. ریزجلبک^۱ منبع جایگزین بسیار خوبی است که می‌توان از آن برای تولید روغن جلبک (algal oil) استفاده کرد. روغن جلبک منبع غنی از DHA است که هم اکنون در برخی فراورده‌ها مانند مکمل غذای نوزادان استفاده می‌شود [۶]. برتری روغن جلبک نسبت به روغن ماهی از نظر تأمین منبع DHA، گیاهی بودن آن، پر شدن سریع و راحت منبع ذخیره‌ی آن، نداشتن خطر آلودگی به فلزات سنگین و حصول محتوی DHA بسیار بالاتر می‌باشد [۷، ۲]. متنوع سازی منابع مصرف DHA مانند تولید غذاهای فراسودمند دارای DHA می‌تواند باعث افزایش دسترسی مردم و مصرف کافی از این ماده غذایی مهم شود. افزودن چنین موادی به فراورده‌های غذایی با چالش‌های زیادی روبرو می‌باشد که پیشگیری از تجزیه اسید چرب، کاهش یا از بین بردن طعم و بوی نامناسب و فائق آمدن بر موضوع ناسازگاری ماهیت آب‌گریزی آن جهت استفاده در فراورده‌های آب‌دوست، از مهم‌ترین آن‌ها می‌باشد. وجود پیوندهای دوگانه غیر اشباع در ساختار DHA، باعث حساسیت و قابلیت اکسایش بالای آن می‌شود. طی اکسایش اسید چرب امگا-۳ پراکسید تولید می‌شود که بعدها تبدیل به فراورده‌های آلدئیدی فرار می‌شود که برخی از آن‌ها تولید مزه و بوی ناخوشایند کرده و سرانجام ویژگی‌های تغذیه‌ای اسید چرب امگا-۳ را کاهش می‌دهند. بنابراین نیاز است که برای بالا بردن کیفیت و بهره‌گیری هر چه بیش‌تر از ویژگی‌های سلامت بخش آن، تدابیری جهت محافظت از این ماده مغذی حساس در طول فرایند تولید و زمان نگهداری فراورده^۲ و همچنین در زمان عبور از شرایط اسیدی و آنزیمی دستگاه گوارش به عمل آید. جلوگیری از اکسایش منابع اسیدهای چرب غیر اشباع امگا-۳ با به کارگیری شرایط نگهداری کنترل شده (هوای ساکن سرد)، افزودن آنتی‌اکسیدان^۳ ها و یا ریزپوشانی^۴ میسر می‌شود که هر کدام از این روش‌ها برتری‌ها و عیب‌هایی دارند [۸]. شرایط نگهداری کنترل شده به جهت نیاز به تعویض همیشگی هوا با باز و بسته شدن مخزن ذخیره، پرهزینه و زمان‌بر است. انتخاب آنتی‌اکسیدان مؤثر نیز چالش برانگیز است. عملکرد آنتی‌اکسیدان‌ها بستگی زیادی به شبکه داشته و اکسیداسیون

(۱) Microalgae

(۳) Antioxidant

(۵) Tocopherol

(۷) Sodium alginate

(۲) Shelf-life

(۴) Microencapsulation

(۶) Hardening

بخش تجربی

کپسول DHA تجاری پرومد (کانادا) از داروخانه تهیه و خلوص اسید چرب DHA موجود در آن با دستگاه کروماتوگرام گازی (اگیانت ۵۹۷۵c، امریکا)، ۵۸٪ ارزیابی شد. پلیمرهای آلزینات و ژلاتین شرکت سیگما - آلدریج و پکتین از شرکت BDH خریداری شدند. استاندارد دوکوزاهگزانوئیک اسید جهت تزریق به دستگاه گاز کروماتوگرافی و برم تری فلوراید متانولی (BF₃) جهت متیل استر کردن نمونه‌ها از شرکت سیگما-آلدریج تهیه شدند. سایر مواد شیمیایی مورد استفاده نیز از درجه تجزیه‌ای بوده و از شرکت مرک خریداری شدند.

ریزپوشانی اسید چرب DHA

مقدار ۱،۵٪ وزنی/حجمی روغن حاوی اسید چرب DHA به وسیله هموژنایزر با دور ۲۴۰۰۰rpm با زیست کامپوزیتی متشکل از ۱،۰۵۹٪ آلزینات، ۰،۵۴۹٪ پکتین و ۰،۳۹۱٪ ژلاتین همگن شده و مخلوط حاصل را به درون سرنگ استریل منتقل کرده و به کمک پمپ سرنگی با نرخ جریان ۱ mL/min به محلول ۵٪ (وزنی/حجمی) کلسیم کلرید افزوده شد. میکروذره‌های کروی و منسجم بی‌درنگ پس از تماس با یون کلسیم تشکیل شدند. مخلوط به مدت حداقل ۳۰ دقیقه دردمای محیط به منظور سفت شدن شبکه نگه‌داری شد. در این روش (ژله ای شدن یونی^۱) یون‌های مثبت کلسیم (Ca²⁺) به دست آمده از محلول کلسیم کلرید با گروه‌های منفی کربوکسیلات (COO⁻) گالاکتورونیک اسید^۲ موجود در سدیم آلزینات، پیوند الکتروستاتیکی یونی - یونی ایجاد کرده و شبکه‌ی بسپاری تشکیل می‌شود. سپس میکروکره‌ها به وسیله‌ی پمپ خلا و کاغذ صافی فیلتر شده و برای آنالیزهای بعدی به طور تازه و یا خشک شده به کمک خشک کن انجمادی مورد استفاده قرار گرفت.

تعیین اندازه کپسول‌ها

در فناوری اکستروژن ذره‌های هیدروکلوئیدی آلزینات، عامل‌های گوناگونی بر اندازه‌ی ذره‌ها تأثیر گذر می‌باشند. اختلاف در اندازه میکروکپسول‌ها می‌تواند از زیر میکرون تا چند میلی متر وسعت داشته باشد. بر اساس مطالعه‌های انجام شده بر روی هیدروژل آلزینات، اندازه کوچک ذره‌ها می‌تواند روی ویژگی‌های حسی و کیفیت فرآورده فراسودمند تأثیر مثبتی داشته باشد. اندازه گیری قطر ذرات سنتز شده در دو حالت تازه و خشک انجام شد. تعیین اندازه ذره‌های تازه با استفاده از دستگاه میکرومتر و ذره‌های خشک شده با خشک کن انجمادی با عکس برداری SEM انجام شد.

یا به صورت کامپوزیت با پلیمرهای دیگر به دلیل داشتن شرایط واکنش ملایم، نیاز نداشتن به حلال‌های سمی، زیست‌سازگارپذیری بالای آلزینات و سادگی انجام عملیات از رایج‌ترین هیدروکلوئیدهای مورد استفاده در ریزپوشانی مواد مغذی می‌باشد. ولی به دلیل محدودیت‌های این سامانه مانند حساسیت نسبت به یون‌ها، نبود استحکام مکانیکی کافی و تخلخل بالای آلزینات، نیاز است تا از پلیمرهای دیگری برای پوشش‌دهی آلزینات برای ایجاد یک غشای نیمه‌تراوای پایدار استفاده کرد. پلیمرهای متفاوتی برای پوشش‌دهی میکروذره‌های سدیم آلزینات استفاده شده است که هر کدام دارای شرایطی ویژه با کارایی و هزینه‌های متفاوتی هستند. پروتئین‌ها به دلیل ایمنی بالا، ارزانی و تنوع مواد برای استفاده در محلول کلوئیدی کامپوزیت، مورد توجه بالایی قرار دارند. ژلاتین، پروتئین به‌دست آمده از کلاژن دناتوره شده می‌باشد که دارای مقدارهای بالای هیدروکسی پرولین، پرولین و گلايسن می‌باشد. دلیل انتخاب ژلاتین در این پژوهش، توانایی بالایی آن در تشکیل غشاء، زیست‌سازگاری و نداشتن سمیت می‌باشد. کاربرد آن به تنهایی به عنوان شبکه‌ی هیدروژلی به دلیل سفت نبودن شبکه محدود است که در صورت افزودن عامل‌های اتصال عرضی بهبود می‌یابد. همچنین به دلیل طبیعت آمفوتری بودن (داشتن همزمان خاصیت اسید و قلیا) می‌تواند انتخاب مناسبی برای ترکیب شدن با پلی ساکارید آنیونی آلزینات باشد [۱۰].

پکتین یک هتروپلی ساکارید آنیونی است که از تعدادی بلوک D-گالاکتورونیک اسید که توسط پیوندهای گلیکوزیدی آلفا ۱ و ۴ به یکدیگر متصل شده‌اند و از دیواره‌ی سلولی گیاهان استخراج می‌شود. به دلیل فرم متوکسیله شده‌ی کم آن، پلیمر مورد توجهی به منظور کپسولاسیون و رهایش هدفمند داروها می‌باشد. برخی از این بلوک‌های گالاکتورونیک اسید استری شده‌اند که بر حسب درجه‌ی استری شدن به دو نوع متوکسیل بالا (HM) و متوکسیل پایین (LM) تقسیم بندی می‌شوند. ساختار گالاکتورونیک اسید مشابه با اسیدهای گلورونیک و مانورونیک در آلزینات می‌باشد. که قابلیت ژل شدن نوع HM آن وابسته به pH و نوع LM آن به سادگی توانایی تشکیل شبکه اتصال عرضی با یون کلسیم را همانند آلزینات دارا می‌باشد [۱۱، ۱۰].

در مجموع با توجه به مطالعات انجام شده و به دلیل نپرداختن پژوهشگران به استفاده از هیدروژل کامپوزیتی آلزینات، پکتین و ژلاتین؛ استفاده از این سامانه‌ی هیدروژلی رویکردی نوین برای ریزکپسوله کردن اسید چرب غیر اشباع DHA برای پوشاندن بو و مزه‌ی نامناسب و کاستن از اکسایش آن و به کارگیری در فرآورده‌های غذایی به حساب می‌آید.

(۱) Ion Gelation

(۲) Galacturonic Acid

مقدار رطوبت میکروکپسول‌ها

۲ گرم از پودر میکروکپسول پس از توزین درون آن ۷۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. محتوای رطوبت با اندازه گیری اختلاف وزنی پیش و پس از خشک کردن تعیین شد (معادله ۱).

$$\text{رطوبت} \% = (M/M_0) \times 100 \quad (1)$$

M وزن نمونه پس از خشک شدن در آن و M₀ وزن نمونه‌ی اولیه می‌باشد که در اینجا ۲ گرم بود [۱۲].

تعیین بازده ریزوشانی اسید چرب DHA

برای اندازه گیری بازده ریزکپسول، لازم است مقدار دقیق روغن سطحی و روغن کل میکروکپسول‌ها تعیین شوند. روغن سطحی با استفاده از روش شستشو لوو و همکاران (۲۰۱۶) به همراه تغییرهای جزئی استخراج شود [۱۳]. برای این منظور ۳ گرم از نمونه میکروکپسول پودر شده با خشک کن انجمادی در ۳۰ میلی لیتر محلول ایزوهگزان/ایزوپروپانول (۳:۱ V/V) پراکنده شده و در دور ۲۲۵ rpm به مدت ۱۵ دقیقه هم‌زده شد. محلول به وسیله کاغذ صافی صاف شده و ذره‌های باقی مانده بر روی کاغذ صافی ۳ دفعه‌ی دیگر با ۱۰ میلی لیتر ایزوهگزان در هر بار شستشو شسته شدند. برای حذف حلال هگزان، محلول فیلتر شده به درون ارلن منتقل شده و بوسیله ی جریان گاز نیتروژن خشک شد. به منظور حذف کامل حلال در آن با دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس به مدت حداقل ۱ ساعت قرار گرفت تا به وزن ثابتی برسد. مقدار روغن سطحی از اختلاف وزن نهایی ارلن و وزن ارلن خالی به دست آمد.

به منظور استخراج روغن کل از روش هضم اسیدی^۲ با استفاده از محلول ۴ HCl M استفاده شد. ۳ گرم از کپسول پودر شده در ۳۰ میلی لیتر محلول ۴ HCl M حل شده و به منظور انحلال مواد دیواره با استفاده از شیکر با دور ۲۲۵ rpm برای مدت ۱۵ دقیقه هم‌زده می‌شود. ۵۰ میلی لیتر ایزوهگزان به مخلوط افزوده شده و برای ۱۸ ساعت در دمای اتاق هم‌زده شد تا روغن به طور کامل استخراج شد. برای حذف حلال، ابتدا محلول در دور ۲۴۴۷۱ × g در ۲۰ °C برای ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شده، فاز رویی شامل هگزان و روغن استخراج شده جمع آوری شد و به وسیله گاز نیتروژن زیر هود خشک شد. نمونه به نسبت خشک شده در آن^۳ با دمای ۱۰۰°C

ریخت شناسی سطح با استفاده از ریز بینی الکترونی روبشی (SEM)

برای دو بررسی شکل و ساختار کپسول تهیه شده، از تصویرهای SEM با بزرگ‌نمایی‌های گوناگون استفاده شد. برای این کار، نمونه خشک شده با استفاده از پوشش نقره آماده شد. نمونه‌ی آماده شده داخل محفظه دستگاه قرار گرفت تا با استفاده از پرتو الکترونی، تصویرهای موردنظر گرفته شود. انرژی پرتو الکترونی تابیده شده به سطح نمونه برابر ۲۰ کیلوولت تعیین شد.

بررسی پیوندهای فیزیکی و شیمیایی با استفاده از نگاره‌سنجی تبدیل**فوریه-فروسرخ (FT-IR)**

برای بررسی پیوند های موجود در مواد و زیست کامپوزیت تهیه شده، از نگاره سنج FT-IR استفاده شد. برای این کار نمونه های خشک شده پس از مخلوط شدن با KBr به صورت قرص خمیری در آمده و با دستگاه FT-IR سنجش شدند. گروه‌های عاملی مربوط به هر نگاره، در بازه عدد موج ۴۰۰-۴۰۰۰ cm⁻¹ تعیین شدند.

بررسی بلورینگی با استفاده از نگاره‌سنجی پراکنش پرتو ایکس (XRD)

برای بررسی ساختارهای بلوری مواد و کپسول DHA، از الگوهای XRD استفاده شد. برای اینکار نمونه های پودر شده با خشک کن انجمادی با دستگاه XRD سنجش شدند. نمونه ها با پرتو CuKα تحت ولتاژ ۴۰ کیلو وات و ۴۰ میلی آمپر سنجش شدند. زاویه‌ی پوشش شده در بازه ی دو تتای ۱۰ تا ۴۰ درجه بود که با سرعت ۰٫۲ درجه بر ثانیه انجام شد.

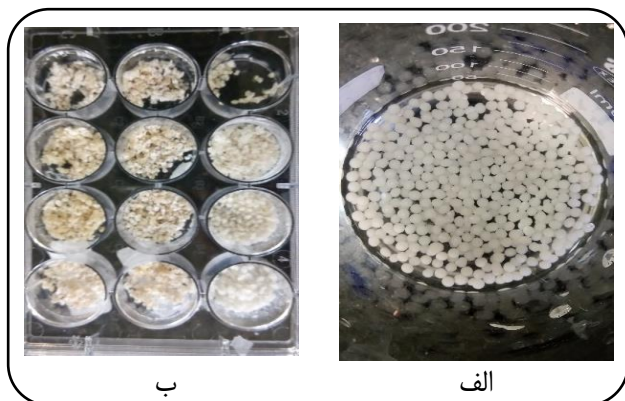
آنالیز گرمایی با استفاده از منحنی‌های ترموگرام (TGA)

برای بررسی و مقایسه ی پایداری گرمایی مواد متشکل کامپوزیت و میکرو کپسول حاصل شده از نمودارهای TGA استفاده شد. میکروکپسول‌های خشک شده به روش انجمادی، بر روی قطعه ی آلومینیومی قرار داده شد. شرایط آزمایش به صورت؛ نرخ گرما ۱۰ °C/min، از دمای ۲۵-۳۰۰ °C در فشار گاز نیتروژن با شدت جریان ۲۰ mL/min و وزن نمونه‌ی ۱۰ mg بود. در مدت فرایند حرارت‌دهی، اختلاف بین وزن و دما، به عنوان تابعی از دما و زمان ثبت شد و منحنی نمونه‌ها رسم شد.

(۱) Thermogravimetric Analysis

(۲) Acid Digestion

(۳) Oven



شکل ۱- (الف) تصویر کپسول‌های تازه سنتز شده، (ب) کپسول‌ها بعد از خشک کردن انجمادی.

جدول ۱- اندازه میکروکپسول‌ها در حالت‌های تازه و خشک.

اندازه کپسول (μm)	کپسول تازه	کپسول خشک
کپسول بدون هسته	۲۸۰۰	۱۵۴۰
کپسول DHA	۲۶۰۰	۱۵۲۰

اختلاف ناچیز در اندازه میکروکپسول‌های دارای هسته و بدون هسته می‌تواند به دلیل اختلاف در شرایط فرایندی (شدت جریان، گرانبوی، فاصله سرسرنگ تا محلول کلسیم و ...) و یا خطای اندازه‌گیری باشد. نتیجه‌های اندازه کپسول‌های کامپوزیتی در این پژوهش، با نتیجه‌های آن‌ها *حق‌شناس و همکاران* (۲۰۱۵ میلادی) همخوانی داشت. طبق نتیجه‌های آن با افزایش میزان اسفرزه و تخم شنبلیله در ترکیب با آلژینات اندازه ذره افزایش یافت. شکل شمایی از میکروکپسول‌های سنتز شده در دو حالت خشک و تازه نشان می‌دهد.

ساختار سطح

شکل ۲ ساختار کلی میکروکپسول دارای اسید چرب پس از خشک شدن بوسیله‌ی خشک کن انجمادی، به همراه ریخت‌شناسی سطح و سطح متقاطع برش خورده را با استفاده از دستگاه الکترونی روبشی (SEM) نشان می‌دهد. میکروکپسول‌ها نخست به صورت ذره‌های به طور کامل کروی مسطح بوده که بعد از خشک شدن با خشک کن انجمادی کمی از حالت کروی خارج شده و دارای سطح چروکیده و زبر شدند [۱۵].

قرار داده شده و در آخر هم زیر هود گذاشته شده تا همه حلال اضافی حذف شود. محتوی روغن به صورت وزنی تعیین شد. درصد روغن سطحی^(۱) (SO%)، روغن کل^(۲) (TO%) و بازده کپسولاسیون (ME%) به ترتیب با استفاده از معادله (۲)، معادله (۳) و معادله (۴) تعیین شدند.

$$SO\% = \frac{w_s}{w_m} \times 100 \quad (2)$$

$$TO\% = \frac{w_t}{w_m} \times 100 \quad (3)$$

$$ME\% = \frac{w_t - w_w}{w_m} \times 100 \quad (4)$$

در اینجا w_s و w_t مقادیر جرمی (گرم) روغن کل و روغن سطحی میکروکپسول‌ها و w_m جرم میکروکپسول‌ها (گرم) می‌باشد.

نتیجه‌ها و بحث

اندازه کپسول‌ها

نتیجه‌های به‌دست آمده اندازه ذره‌ها پیش و پس از خشک کردن با خشک‌کن انجمادی در جدول ۱ ارائه شده است. مطالعه‌های همانند، میکروذره‌ها به روش اکستروژن اندازه متوسط ۱٫۵ تا ۱٫۹ میلی‌متر را نشان دادند که این اختلاف به دلیل نوع مواد به کار رفته، شرایط فرایند و دستگاه‌های استفاده شده می‌باشد. کپسول‌های با قطر ۱ میلی‌متر در نتیجه نازل گیج ۲۱ به‌دست می‌آید. به منظور تشکیل کپسول‌های با قطر ریزتر نیاز به نازل با گیج بیشتر می‌باشد. اما دستیابی به قطره‌ها خیلی ریزتر نیاز به تجهیزهای ویژه‌ای دارد. بیش‌تر این تجهیزها دارای نازل‌های ویژه‌ای برای پاشش خیلی ریز محلول می‌باشند. بنابراین، مهم‌ترین عامل اثرگذار بر اندازه‌ی ذره‌ها، شیوه‌ی اکستروژن کردن سوسپانسیون باکتری درون محلول کاتیونی کلسیم کلرید می‌باشد. دستگاه‌های بسیاری تاکنون اختراع شده و به کار گرفته شده‌اند که شامل پاشش هوا^۳، پاشش الکتروستاتیکی با ولتاژ بالا^۴، تجزیه جریان سریع جت^۵ شامل نازل ارتعاشی^۶ و جت برنده^۷، دیسک چرخان^۸، کانال میکرونازل^۹، سامانه دیسک اتمایزر کاسه‌ای گردابی^{۱۰} می‌باشند. همه این تجهیزها به دلیل غیر مداوم بودن و پیچیدگی عملیات، مشکل افزایش مقیاس و صنعتی شدن را دارند [۱۴].

(۱) Surface Oil

(۳) Air atomization

(۵) Jet break-up

(۷) Jet-cutter technology

(۹) Micronozzle array

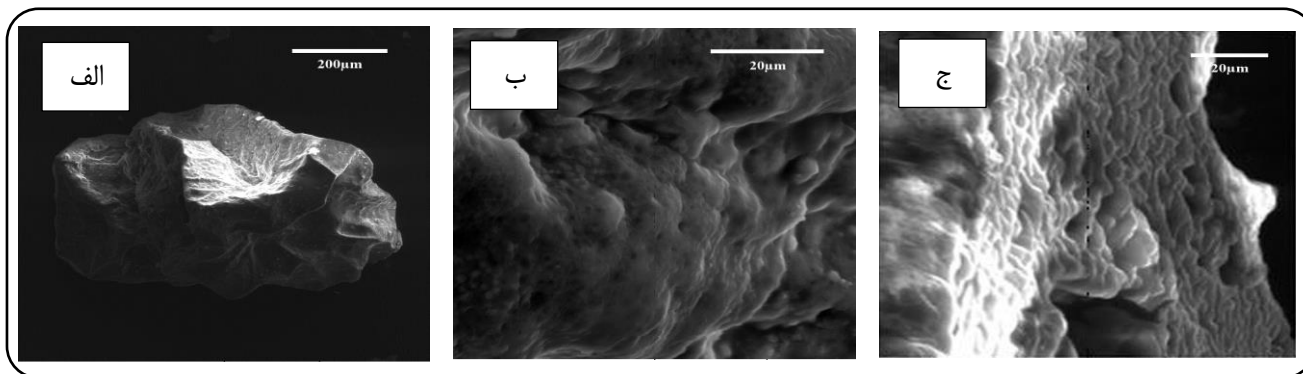
(۲) Total Oil

(۴) Electrostatic atomization

(۶) Vibration nozzle technology

(۸) Spinning disk atomization

(۱۰) Voretz-Bowl Disk Atomizer System



شکل ۲ - تصاویر SEM (الف) ساختار کلی، (ب) ریخت شناسی سطح، (ج) سطح مقطع برش خورده میکروکپسول DHA.

پکتین، عدد موج $2.34 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$ و 2932 و 1619 به ترتیب مربوط به کشش پیوند ارتعاشی O-H و C-H بوده و عددهای 1623 cm^{-1} و 1740 به ترتیب مربوط به گروه C=O گروه کربوکسیل و کربوکسی متیل ($-\text{COOCH}_3$) آن می‌باشد [۱۹]. اتصال عرضی آلزینات با یون کلسیم باعث جابه‌جایی عدد موج مربوط به پیوند کششی کربوکسیل - COO به مقدار بالاتر می‌شود. پیک جدیدی در کپسول کامپوزیت دیده می‌شود که مربوط به پیوند کششی C-O در گروه کربوکسیلی پکتین می‌باشد [۱۹]. پیک‌های مربوط به روغن دارای اسید چرب DHA از تعداد و شدت بالایی برخوردار می‌باشند. اعداد موج 1503 ، 2970 ، 2920 ، 2850 مربوط به پیوند کششی C-H که به ترتیب مربوط به سیس - آلکالین ($-\text{HC}=\text{CH}-$)، گروه متیل ($-\text{CH}_3$) لیپیدها و دو مورد آخر مربوط به گروه متیلن ($-\text{CH}_2$) می‌باشند. 1740 cm^{-1} مربوط به پیوند C=O در گروه استری، 1460 cm^{-1} و 1150 مربوط به گروه متیلن ($-\text{CH}_2$)، و 1090 cm^{-1} نشان دهنده تری گلیسیریدها می‌باشد [۲۰]. همان‌گونه که دیده می‌شود تأثیر قابل توجه این پیک‌ها بر پیک‌های موجود در طیف مربوط به کپسول‌های دارای DHA نیز دیده می‌شوند که دلیلی بر محصور شدن ماده DHA درون شبکه کامپوزیتی می‌باشد.

بررسی بلورینگی پلیمرهای اولیه و میکروکپسول

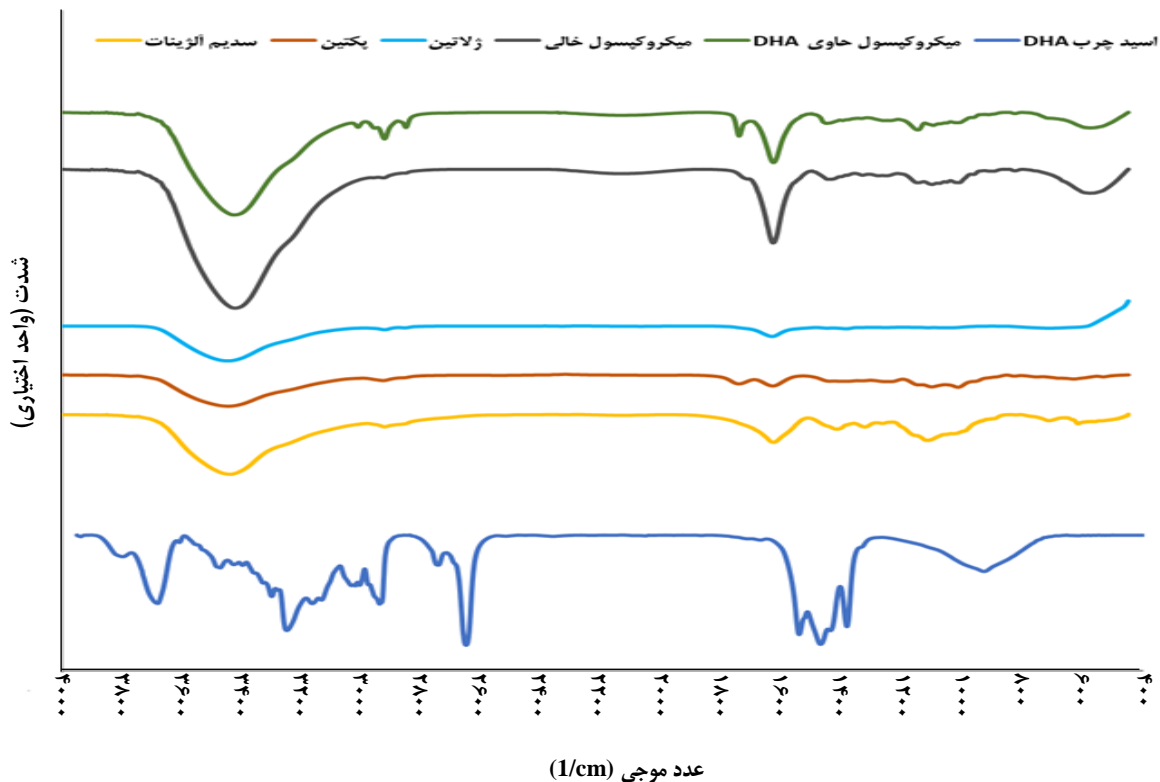
با استفاده از اطلاعات تکمیلی به دست آمده از الگوهای XRD می‌توان به بلوری یا بی‌شکل (غیر بلوری) بودن ساختار ترکیب اجزای کامپوزیت و میکروکپسول دارای اسید چرب DHA پی برد (شکل ۴). با دیدن الگوی XRD مربوط به پلیمرها، ساختار بلوری برای آلزینات و پکتین و شبه بلوری برای ژلاتین دیده می‌شود. اسید چرب DHA با داشتن یک پیک در زاویه 2θ 20.8 درجه، ساختار شبه بلوری دارد.

طبق گزارش کیم و همکاران [۱۶] این چروکیدگی سطح به دلیل از دست رفتن محتوی آب گیر افتاده در درون هیدروژل طی فرایند خشک کردن انجمادی می‌باشد. این بی‌نظمی در سطح، غلظت بالاتر پلیمر را منعکس می‌کند [۱۷]. در کپسول‌های دارای اسید چرب، شکل مسطح تر و با تقعر کم‌تری دیده می‌شود ولی در کپسول بدون اسید چرب تقعر و فرورفتگی‌ها به مراتب بیش‌تر دیده می‌شوند که نشان می‌دهد وجود ذرات روغن باعث کاهش تبخیر رطوبت در زمان خشک کردن انجمادی شده و در نتیجه کاهش وسعت چروکیدگی شده است.

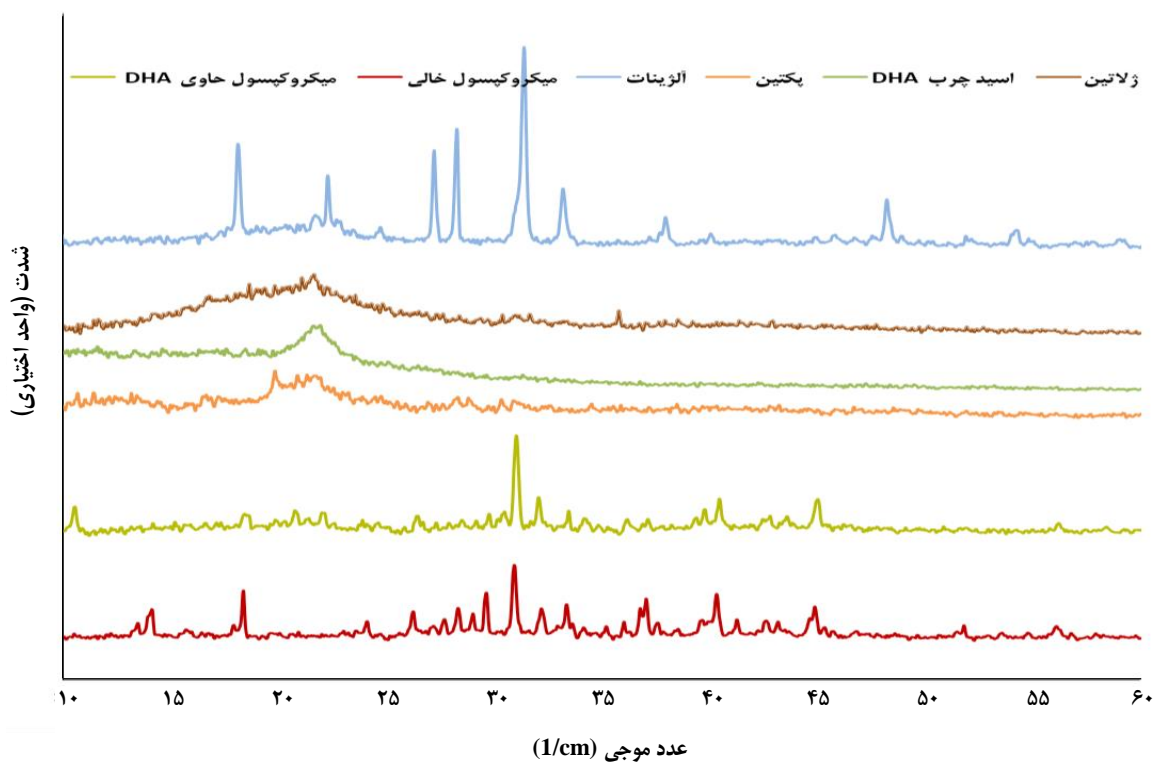
بررسی پیوندهای فیزیکی و شیمیایی پلیمرهای اولیه و میکروکپسول

به منظور بررسی تراکنش بین پلیمرها و هسته، طیف بینی FT-IR مورد استفاده قرار گرفته است (شکل ۳). طیف های FT-IR مربوط به ذره‌های خالص کامپوزیت، اسید چرب DHA و میکروکپسول دارای اسید چرب DHA همچنین میکروکپسول بدون هسته را نشان می‌دهد. برای ژلاتین، عدد موج 3508 ، 351 cm^{-1} مشخص کننده پیوند آمینی N-H مربوط به کشش پیوند بین اتم های N، H بوده و عدد موج 1564 ، 127 cm^{-1} مربوط به خمش ارتعاشی بین این دو اتم می‌باشد. پیک بسیار ضعیفی در 1336 ، 69 cm^{-1} دیده می‌شود که مربوط به پیوند C-N می‌باشد [۱۸]. پیک دیده شده در 3444 cm^{-1} در نگاره ی سدیم آلزینات مربوط به کشش پیوندی O-H می‌باشد که در تمام نگاره ها دیده می‌شود. ارتعاش‌های کششی مربوط به پیوند متقارن و نامتقارن آلفاتیکی C-H در عدد موج 2934 cm^{-1} دیده می‌شود. پیک دیده شده در عدد موج 1620 cm^{-1} پیک ارتعاشی کششی نامتقارن پیوند COO^- و عدد موج 1420 cm^{-1} مربوط به پیک ارتعاشی کششی متقارن گروه کربوکسیل COO^- را نشان می‌دهد. عددهای موج 1320 cm^{-1} و 1120 cm^{-1} نیز به ترتیب مربوط به کشش پیوند C-O و C-C می‌باشند. در نگاره ی

(۱) Kim C. et al



شکل ۳ - نگاره های FTIR زیست کامپوزیت اسید چرب DHA و اجزای آن



شکل ۴ - الگوهای XRD زیست کامپوزیت اسید چرب DHA و اجزای آن

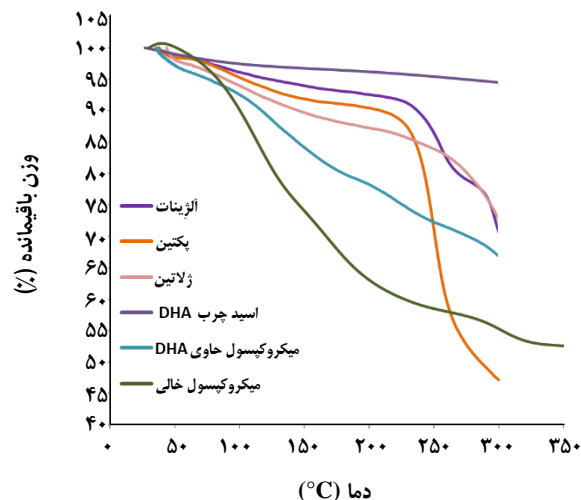
بنابراین تغییرها در طول فرایند گرمایی را می‌توان از طریق منحنی ترموگرام برای هر نمونه بررسی کرد. منحنی ترموگرام برای روغن DHA، سدیم آلزینات، پکتین و ژلاتین خالص و همچنین میکروکپسول DHA در بازه‌ی 20°C تا 350°C در شکل نشان داده شده است [۲۳]. منحنی ترموگرام سدیم آلزینات سه مرحله‌ی اتلاف وزن را نشان داد. مرحله‌ی اول در حدود دمای 30°C – 230°C بود و تغییرهای جزئی وزن دیده شده به دلیل تبخیر رطوبت بود. طی مرحله دوم که تا دمای 370°C بوده، اتلاف وزن به ۲۰٪ رسیده و مابقی آن در مرحله سوم که از دمای نزدیک به 285°C شروع شد، به پایان رسید. پکتین تا نزدیک دمای 320°C پایدار بود و ۴۵٪ اتلاف وزن آن در این مرحله اتفاق افتاد. مرحله‌ی اول افت وزن ژلاتین در بازه‌ی 50°C – 100°C و مرحله‌ی دوم در بازه‌ی 200°C – 250°C و مربوط به تجزیه گرمایی شبکه‌ی ژلاتین بود [۲۴]. روغن دارای اسید چرب DHA در کل مدت گرمادهی پایداری گرمایی خود را حفظ کرد و فقط ۵٪ اتلاف وزن دیده شد. پس از تشکیل کامپوزیت، اتلاف وزن با شیب بسیار تندی اتفاق افتاد که مرحله‌ی اول آن مربوط به رطوبت بالای کپسول بود سپس از دمای 300°C درجه اتفاق افتاد. کپسول دارای DHA از پایداری گرمایی بسیار بالاتری نسبت به کپسول خالی برخوردار بود. در دمای 300°C اتلاف وزن آن ۱۰٪ کم‌تر از کپسول خالی بود که این به دلیل پایداری گرمایی بالای قطره‌های روغن به دام افتاده درون کپسول بود.

محتوی رطوبت

محتوی رطوبت میکروکپسول‌های پودر شده با خشک کن انجمادی اندازه‌گیری شد. مقدار رطوبت پودر به‌دست آمده وابسته به بازده خشک شدن بوده و به دلیل تأثیر آن روی رفتار بلورینگی بر قابلیت جریان پودر و پایداری نگهداری تأثیر گذار می‌باشد [۲۳]. هر گونه رطوبت افزون موجب به هم چسبیدگی و ایجاد کپک می‌شود. مقدار رطوبت میکروکپسول‌ها ۱۳٫۶۷٪ ارزیابی شد که رطوبت به نسبت بالا افزون بر پارامترهای متغیر دستگاه خشک کن انجمادی مورد استفاده، هسته DHA بود. ذره‌های روغنی مانع تبخیر کامل آب درون کپسول شده و مقدار رطوبت پودر به‌دست آمده بیش‌تری را سبب می‌شوند.

بازده ریزپوشانی اسید چرب DHA

روغن سطحی به دلیل اکسایش سریع در حضور اکسیژن، فاکتور مهمی در پایداری میکروکپسول می‌باشد [۲۳]. بازده کپسولاسیون شاخص مهمی برای میکروکپسول بوده و اشاره به پتانسیل مواد دیواره جهت نگهداری ماده‌ی درون آن دارد. همچنین، با مشخص بودن



شکل ۱- منحنی ترموگرام نمونه‌های پلیمر و میکروکپسول

با مقایسه‌ی الگوی پراش مربوط به کامپوزیت تشکیل شده نسبت به الگوی پلیمرهای خالص، دیده شد که ساختار کریستالی آلزینات به دلیل داشتن ۵۰٪ از کل غلظت زیست کامپوزیت، بر روی ساختار کامپوزیت تأثیر غالبی داشته است و پس از تشکیل کامپوزیت تعداد پیک‌های بیش‌تری دیده شد که نشان می‌دهد پیوندهای بین پلیمرها و اتصال عرضی آلزینات و پکتین با یون کلسیم باعث ایجاد نظم بیش‌تر شبکه شده است. نتیجه‌های همانندی توسط یانگ و همکاران (۲۰۰۰ میلادی)، با مطالعه بر روی ترکیب آلزینات - سلولز مشبک شده با یون کلسیم به‌دست آمد [۲۱]. طبق گزارش ایرات و همکاران (۲۰۱۵ میلادی)، نتیجه‌های همانندی در خصوص ایجاد شبکه آمورف در میکروکپسول‌های پروبیوتیک صرف نظر از روش خشک شدن (خشک شدن پاششی یا انجمادی) به‌دست آمد. افزودن DHA به امپوزیت باعث کاهش شدت برخی از پیک‌ها شده و مقداری بی‌نظمی در شبکه ایجاد می‌کند. همچنین پیک جدیدی در زاویه دو تنای 22° و 20.8° درجه ایجاد شده است که در حدود زاویه‌ی DHA خالص است و می‌توان گفت که توانسته درون کامپوزیت احاطه شود. شبکه‌های بی‌شکل، دارای حلالیت بیش‌تر و با قابلیت جذب رطوبت بیش‌تر بوده و رهایش هسته به راحتی امکان پذیر می‌باشد [۲۲].

آنالیز گرمایی پلیمرهای اولیه و میکروکپسول

آنالیز TGA به منظور بررسی ارتباط بین وزن باقی‌مانده و دما برای نمونه تحت برنامه‌ی کنترل دمایی استفاده شد. هنگامی که نمونه گرم دریافت می‌کند، واکنش‌های شیمیایی رخ می‌دهد و کیفیت نمونه را دستخوش تغییر می‌نماید. با استفاده از منحنی ترموگرام می‌توان تغییرات فیزیکی - شیمیایی رخ داده در طول فرایند را پیش بینی کرد.

جدول ۲ - مقدارهای روغن سطحی، روغن کل، روغن اولیه، بازده ریزپوشانی و بازده فرایند.

بازده فرآیند (%)	بازده ریزپوشانی (%)	کپسول (g)	روغن اولیه (g)	روغن کل (mg)	روغن سطحی (mg)	کپسول
۸۸,۹۷	۷۰,۷۸	۹,۴۱۴	۰,۲۵۵	۲۴,۱	۷,۰۴	

نتیجه گیری

در پژوهش حاضر، ریزپوشانی اسید چرب DHA درون زیست کامپوزیت آلژینات، پکتین و ژلاتین با هدف دستیابی به ریزذره‌های DHA به منظور به کارگیری در فرآورده‌های فراسودمند بررسی شد. این زیست کامپوزیت به منظور ارایه سامانه‌ای نوین در راستای اصلاح شبکه‌ی هیدروژلی آلژینات بود تا بتواند ضمن محافظت هر چه بیش تر از هسته در شرایط شبیه‌سازی شده گوارش، برای سادگی تجاری‌سازی از ترکیب‌های پلیمری با قیمت پایین، زیست تخریب پذیر، تجدیدپذیر و از درجه غذایی باشد. نتیجه‌های مربوط به آنالیزهای FT-IR و XRD، محصور شدن اسید چرب درون این کامپوزیت را به خوبی تأیید کرد. ضمن این که نبود پیک‌های جدید در منحنی FT-IR نشان داد که اسید چرب به وسیله ی پیوندهای فیزیکی هیدروژنی و اندروالسی بدام افتاده و واکنش شیمیایی بین هسته و پلیمر و یا بین پلیمرها رخ نداده که این امر موجب جلوگیری از آسیب رساندن به اسید چرب شده است. بازده بالای ریزپوشانی اسید چرب و فرایند ریزپوشانی نیز گواهی بر موفقیت آمیز بودن روش هیدروژل آلژینات برای این منظور بود. مطالعه‌های بیش تر در راستای توسعه این پژوهش در زمینه رهایش و پایداری اکسایشی اسید چرب در محیط شبیه‌سازی شده گوارش مورد نیاز است.

بازده ریزپوشانی می توان سطح مناسب میکروکپسول برای افزودن به ماده غذایی را محاسبه کرد. برای این منظور میزان روغن سطحی و روغن کل تعیین شد. مقدارهای به دست آمده در شکل ارایه شده است. پورعاشوری و همکاران^۱، ریزپوشانی روغن ماهی را در جداره‌های گوناگون ژلاتین، کیتوسان، مالتودکسترین و ترانس گلوتامیناز بررسی کردند و دیدند ریزپوشانی در مواردی که در ترکیب جداره ژلاتین وجود دارد بازده ریزپوشانی به طور چشمگیری افزایش یافته است [۲۵]. آن‌ها بیان کردند که حضور پروتئین و کربوهیدرات، می تواند روی ویژگی‌های فیزیکی مواد جداره اثر داشته و فرآیند ریزپوشانی را بهبود بخشد. ایلایسگلو^۲ نانوکپسول روغن ماهی را درون کامپوزیت پروتئین - پلی ساکارید کازئینات و صمغ عربی بررسی کرده و به بازده حدود ۷۸٪ دست یافتند [۲۶]. در گزارش دیگری که توسط پنیچه و همکاران^۳ ارائه شد. بازده ریزپوشانی برای نسبت های گوناگون آلژینات به روغن بین ۴۲٪ تا ۹۲٪ تعیین شد [۲۷]. هینزلمان و همکاران^۴ دیدند بازده ریزپوشانی با روش خشک کردن انجمادی با تغییر پارامترهای فرایند بین ۲۹,۴٪ تا ۸۱,۶٪ متغیر است [۲۸]. در گزارش ونگ و همکاران^۵ (۲۰۱۶ میلادی)، دیده شد که با ریزپوشانی روغن ماهی دارای DHA ۵۰٪ بازده بین ۱۳,۱٪ تا ۹۳,۲٪ به دست آمد [۲۹]. این تغییرهای چشمگیر بازده مربوط به تغییر محتوی پروتئین آب پنیر (WPI^۶) بود که تأثیر مثبتی بر بازده نشان داد. همان گونه که دیده شد، مقدار بازده به دست آمده در این پژوهش با مقدارهای مطالعه‌های پیشین مطابقت خوبی دارد.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۱۲ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۳/۲۰

مراجع

- [1] Argin S., "Microencapsulation of Probiotic Bacteria in Xanthan-Chitosan Polyelectrolyte Complex Gels", University of Maryland, College Park, (2007).
- [2] Wang C., Chung M., Lichtenstein A., Balk E., Kupelnick B., *Effects of Omega-3 Fatty Acids on Cardiovascular Disease*, Rockville, MD: Agency for Healthcare Research and Quality, 94:5-9 (2004).

(۱) Pourashoori P. et al

(۳) Peniche C. et al

(۵) Wang C. et al

(۲) Ilyasoglu H. et al

(۴) Heinzelmann K. et al

(۶) Whey protein isolate

- [3] Schachter H.M., Kourad K., Merali Z., Lumb A., Tran K., Miguelez M., [Effects of Omega-3 Fatty Acids on Mental Health](#), *Rockville, MD: Agency for Healthcare Research and Quality*, **94**: 1-11, (2005).
- [4] MacLean C., Issa A., Newberry S., and Mojica W., [Effects of Omega-3 Fatty Acids on Cognitive Function with Aging, Dementia, and Neurological Diseases](#), *Rockville, MD: Agency for Healthcare Research and Quality*, **94** : 1-3 (2005).
- [5] Hodge W., Barnes D., Schachter H.M., Pan Y., Lowcock E.C., Zhang L., Sampson M., Morrison A., Fran K., Miguelez M., Lewin G., [Effects of Omega-3 Fatty Acids on Eye Health](#), *Rockville, MD: Agency for Healthcare Research and Quality*, **94**: 12-18 , (2005).
- [6] Ward O.P., Singh A., [Omega-3/6 Fatty Acids: Alternative Sources of Production](#). *Process Biochem.*, **40**: 3627–3652 (2005).
- [7] New M.B., Wijkström U.N. ,“[Use of Fishmeal and Fish Oil in Aquafeeds: Further Thoughts on the Fishmeal Trap](#)”, FAO Fisheries Circular (FAO), (2002).
- [8] Orders M.E., "Fate of Omega-3 Fatty Acids from Algae in Mozzarella Cheese", Msc. Thesis, Virginia Polytechnic Institute and State University (2008).
- [9] Hannah S., “[Microencapsulation of an Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid Source with Polysaccharides for Food Applications](#)”, Ph.D Dissertation, Virginia Polytechnic Institute and State University (2009).
- [10] Nualkaekul S., Cook M.T., Khutoryanskiy V.V., Charalampopoulos D., [Influence of Encapsulation and Coating Materials on the Survival of Lactobacillus Plantarum and Bifidobacterium Longum in Fruit Juices](#), *Food Res. Int.*, **53**: 304–311 (2013).
- [11] Saravanan M., Rao K.P., [Pectin-Gelatin and Alginate-Gelatin Complex Coacervation for Controlled Drug Delivery: Influence of Anionic Polysaccharides and Drugs Being Encapsulated on Physicochemical Properties of Microcapsules](#), *Carbohydr. Polym.*, **80** : 808–816, (2010).
- [12] Klinkesorn U., Sophanodora P., Chinachoti P., Decker E.A., McClements D.J., [Characterization of Spray-Dried Tuna Oil Emulsified In Two-Layered Interfacial Membranes Prepared Using Electrostatic Layer-By-Layer Deposition](#), *Food Res. Int.*, **39** : 449–457, May (2006).
- [13] Liu H., Wang L., Yang T., Zhang G., Huang J., Sun J., Huo J., [Optimization and Evaluation of Fish Oil Microcapsules](#), *Particuology*, **29** : 162–168, (2016).
- [14] Silva M.P., Tulini F.L., Martins E., Penning M., Fávoro-Trindade C.S., Poncelet D., [Comparison of Etrusion and co-Extrusion Encapsulation Techniques to Protect Lactobacillus acidophilus LA3 in Simulated Gastrointestinal Fluids](#), *LWT - Food Sci. Technol.*, **89** : 392–399 (2018).
- [15] Yeung T.W., Üçok E.F., Tiani K.A., McClements D.J., Sela D.A., [Microencapsulation in Alginate and Chitosan Microgels to Enhance Viability of Bifidobacterium longum for Oral Delivery](#), *Front. Microbiol.*, **7** : 1–11 (2016).

- [16] Kim H. J., Cho S. J., Kim S.Y., Song S.H., Shin O.J., Cha I.S., Park D.S., [Effect of Microencapsulation on Viability and other Characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121](#), *LWT-Food Sci. Technol.*, **41**: 493–500, (2008).
- [17] Fareez I. M., S Lim. M., Mishra R. K., Ramasamy K., [Chitosan Coated Alginate-Xanthan Gum Bead Enhanced Ph and Thermotolerance of *Lactobacillus plantarum* LAB12](#), *Int. J. Biol. Macromol.*, **72** : 1419–1428 (2015).
- [18] Tu L., He Y., Yang H., Wu Z., Yi L., [Preparation and Characterization of Alginate-Gelatin Microencapsulated *Bacillus subtilis* SL-13 by emulsification/Internal Gelation](#), *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **26** : 735–749 (2015).
- [19] Jaya S., Durance T. D., Wang R., [Effect of Alginate-Pectin Composition on Drug Release Characteristics of Microcapsules](#), *J. Microencapsul.*, **26** : 143–153, (2009).
- [20] Vongsvivut J., Heraud P., Zhang W., Kralovec J. A., McNaughton D., Barrow C.J., [Quantitative Determination of Fatty Acid Compositions n Micro-Encapsulated Fish-Oil Supplements Using Fourier Transform Infrared \(FTIR\) Spectroscopy](#), *Food Chem.*, **135** : 603–609 (2012).
- [21] Yang G., Zhang L., Peng T., Zhong W., [Effects of Ca²⁺ Bridge Cross-Linking on Structure and Pervaporation of Cellulose / Alginate Blend Membranes](#), *J. Memb. Sci.*, **175** : 53–60 (2000).
- [22] Eratte D., McKnight S., Gengenbach T.R., Dowling K., Barrow C.J., Adhikari B.P., [Co-Encapsulation and Characterisation of Omega-3 Fatty Acids and Probiotic Bacteria in Whey Protein Isolate-Gum Arabic Complex Coacervates](#), *J. Funct. Foods*, **19** : 882–892, (2015).
- [23] Chen W., Wang H., Zhang K., Gao F., Chen S., Li D., [Physicochemical Properties and Storage Stability of Microencapsulated DHA-Rich Oil with Different Wall Materials](#), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **179** : 1129–1142, (2016).
- [24] Mishra R.K., Majeed A.B.A., Banthia A.K., [Development and Characterization of Pectin/Gelatin Hydrogel Membranes for Wound Dressing](#), *Int. J. Plast. Technol.*, **15** : 82–95 (2011).
- [25] Pourashouri P., Shabanpour B., Razavi S.H., Jafari S.M., Shabani A., Aubourg S.P., [Impact of Wall Materials on Physicochemical Properties of Microencapsulated Fish Oil by Spray Drying](#), *Food Bioprocess Technol.*, **7** : 2354–2365 (2014).
- [26] Ilyasoglu H., El N., [“Nanoencapsulation of EPA/DHA with Sodium Caseinate-Gum Arabic Complex and Its Usage in the Enrichment of Fruit Juice](#), *LWT - Food Sci. Technol.*, **56** : 461–468 (2014).
- [27] Peniche C., Howland I., Carrillo O., Zaldívar C., Argüelles-Monal W., [Formation and Stability of Shak Liver Oil Loaded Chitosan Calcium Alginate Capsules](#), *Food Hydrocoll.*, **18** : 865–871 (2004).
- [28] Heinzelmann K., Franke K., Velasco J., Márquez-Ruiz G., [Microencapsulation of Fish Oil by Freeze-Drying Techniques and Influence of Process Parameters on Oxidative Stability During Storage](#),” *Eur. Food Res. Technol.*, **211** : 234–239 (2000).
- [29] Wang Y., Liu W., Dong Chen X., Selmulya C., [Micro-Encapsulation and Stabilization of DHA Containing Fish oil_Droplet Spray Dryer](#), *J. Food Eng.*, **175** : 74–84 (2016).