

## Evaluation of the properties of double emulsions (W/O/W) stabilized with whey protein isolate-inulin conjugate

Adeleh Mohammadi, Mohammad Ghorbani\*, Alireza Sadeghi Mahoonak,  
Seyed Mahdi Jafari

<sup>1</sup> PhD student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

<sup>2</sup> Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran, (\*Corresponding author; Email address: moghorbani@yahoo.com)

### Article Info

Article type:  
Research Full Paper

### Article history:

Received: 2025-09-06  
Revised: 2025-10-24  
Accepted: 2025-12-20

### Keywords:

W/O/W emulsions  
Maillard conjugation  
Whey protein isolate  
Inulin

### ABSTRACT

**Background and objectives:** The glycation of Proteins is usually considered the first step of the Maillard reaction. Studies have shown that the functional properties of whey protein isolate have been significantly improved by conjugation by carbohydrates through the Millard process. Therefore, this research aims to stabilize double emulsions (W/O/W) with whey protein isolate-inulin conjugates.

**Materials and methods:** The conjugation variables were WPI to inulin ratios (1:1, 1:2, and 2:1 w/w) and incubation temperatures (60 and 80°C) at 79% relative humidity for 24 h. In this study, we investigated the sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS- PAGE), Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), and the color of conjugates. The apparent viscosity, particle size and distribution, zeta potential, and creaming of W/O/W emulsions were measured during storage time.

**Results:** The droplet size of W/O/W emulsions stabilized with conjugates produced at 80 ° C was less than the conjugates prepared at 60° C. The 2:1 and 1:2 weight ratios of whey protein isolate-inulin showed the maximum and minimum droplet size of emulsions during storage. Emulsions stabilized by conjugates produced by heating at 80°C had higher zeta potential than emulsions stabilized with conjugates produced by heating at 60°C on the first day of production. The W1/O/W2 emulsions stabilized by a 1:2 ratio of whey protein isolate-inulin conjugate showed a higher zeta potential value on the first day and after 21 days of storage.

**Conclusion:** Generally, the results showed that whey protein isolate-inulin conjugates have a favorable ability to stabilize double emulsions, especially a weight ratio of 1:2, hence these emulsions can be used for the encapsulation of various bioactive compounds.

**Cite this article:** Mohammadi, A., Ghorbani, M., A.R., Jafari, S.M. 2026. Evaluation of the properties of double emulsions (W/O/W) stabilized with whey protein isolate-inulin conjugate. *Food Processing and Preservation Journal*, 17(4), 105-125.



© The Author(s)



[10.22069/fppj.2022.20752.1726](https://doi.org/10.22069/fppj.2022.20752.1726)

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

## ارزیابی ویژگی‌های امولسیون‌های دوگانه (W/O/W) تثبیت شده با کونژوگه ایزوله پروتئین آب پنیر - اینولین

عادل محمدی<sup>۱</sup>، محمد قربانی<sup>۲\*</sup>، علیرضا صادقی ماهونک<sup>۲</sup>، سیدمهدی جعفری<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> دانش آموخته دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

<sup>۲</sup> استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

(\* رایانامه نویسنده مسئول: moghorbani@yahoo.com)

اطلاعات مقاله	چکیده
<b>نوع مقاله:</b> مقاله کامل علمی-پژوهشی	<b>سابقه و هدف:</b> گلیکوزیلاسیون پروتئین معمولاً به عنوان مرحله اول واکنش میلارد در نظر گرفته می‌شود. مطالعات انجام گرفته در سال‌های اخیر مشخص ساختند که خصوصیات کاربردی ایزوله پروتئین آب پنیر توسط کونژوگه شدن با کربوهیدرات‌ها از طریق فرایند میلارد بهبود چشم‌گیری یافته است. لذا هدف از این پژوهش استفاده از کونژوگه ایزوله پروتئین آب پنیر- اینولین جهت تثبیت امولسیون‌های دوگانه (W/O/W) می‌باشد.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۶/۱۵ تاریخ ویرایش: ۱۴۰۴/۸/۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۹/۲۹	<b>مواد و روش‌ها:</b> در این پژوهش کونژوگه‌های ایزوله پروتئین آب پنیر- اینولین (نسبت وزنی ۱:۱، ۱:۲ و ۲:۱) توسط واکنش میلارد و به روش مرطوب در دمای ۶۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد تولید گردید. پروفایل الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید (SDS-PAGE) کونژوگه‌های ایزوله پروتئین آب پنیر- اینولین، طیف‌سنجی تبلیل فوریه مادون قرمز (FT-IR) ارزیابی و تغییرات رنگ کونژوگه‌ها اندازه‌گیری شد. سپس از کونژوگه‌های حاصل برای تولید امولسیون دوگانه (W/O/W) استفاده و اندازه قطرات، پتانسیل زتا، ویسکوزیته و خامه ای شدن امولسیون‌های حاصل بررسی گردید.
<b>واژه‌های کلیدی:</b> امولسیون دوگانه کونژوگه میلارد ایزوله پروتئین آب پنیر اینولین	<b>یافته‌ها:</b> بررسی اندازه قطرات امولسیون‌های دوگانه (W/O/W) نشان داد که متوسط اندازه قطرات امولسیون‌های تثبیت شده با کونژوگه‌های تولیدشده در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد کمتر از اندازه قطرات امولسیون‌های پایدار شده با کونژوگه‌های تولیدی در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد بود. نسبت ۲:۱ و ۱:۲ کونژوگه ایزوله پروتئین آب پنیر - اینولین به ترتیب کمترین و بیشترین اندازه قطرات را در روز نخست و بعد از ۲۱ روز نگهداری نشان دادند. نتایج بررسی ویسکوزیته امولسیون‌ها نیز مشخص ساخت که امولسیون‌های دوگانه تثبیت شده با نسبت ۲:۱ کونژوگه ایزوله پروتئین آب پنیر - اینولین دارای ویسکوزیته کمتری نسبت به سایر امولسیون‌ها بودند. امولسیون‌های تثبیت شده با کونژوگه‌های انکوبه شده در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد پتانسیل زتا منفی بیشتری نسبت به امولسیون‌های تثبیت شده با کونژوگه‌های انکوبه شده در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد در نسبت‌های یکسان وزنی پروتئین - پلی ساکارید در روز نخست

---

تولید نشان دادند. همچنین امولسیون‌های تثبیت شده با نسبت ۱:۲ کونژوگه ایزوله پروتئین آب پنیر - اینولین که در دمای ۶۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد تولید شده بودند، مقدار پتانسیل زتا بیشتری را در روز نخست و بعد از ۲۱ روز نگهداری نشان دادند.

**نتیجه‌گیری:** به‌طور کلی مشخص شد که کونژوگه‌های ایزوله پروتئین آب پنیر - اینولین توانایی مطلوبی جهت تثبیت امولسیون‌های دوگانه به خصوص در نسبت وزنی ۱:۲ دارند، از این رو می‌توان از این امولسیون‌ها جهت ریزپوشانی ترکیبات زیست فعال مختلف استفاده نمود.

---

**استناد:** محمدی، عادل؛ قربانی، محمد؛ صادقی ماهونک، علیرضا؛ جعفری، سیدمهدی. (۱۴۰۴). ارزیابی ویژگی‌های امولسیون های دوگانه (W/O/W) تثبیت شده با کونژوگه ایزوله پروتئین آب پنیر - اینولین. *فرآوری و نگهداری مواد غذایی*، ۱۷(۴)، ۱۰۵-۱۲۵.

---

 [10.22069/fppj.2022.20752.1726](https://doi.org/10.22069/fppj.2022.20752.1726)

© نویسنده‌گان



ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

---

### مقدمه

امولسیون‌ها دیسپرسیون‌های کلوئیدی متشکل از حداقل دو هایع غیر قابل امتزاج (معمولاً آب و روغن) بوده که یکی از آن‌ها در دیگری به شکل قطرات کوچک پراکنده شده است. دانش و تکنولوژی امولسیون در صنعت غذا برای تولید طیف گسترده‌ای از محصولات غذایی مانند نوشیدنی‌ها، شیرها، خامه‌ها، سس‌ها، مایونز، مارگارین و کره استفاده می‌شود. ماهیت امولسیون‌ها به این محصولات غذایی ویژگی‌های عملکردی متمایزی مانند ظاهر مطلوب، بافت، احساس دهانی، طعم و مزه می‌بخشد. علاوه بر این، امولسیون‌ها سامانه پرکاربردی جهت ریزپوشانی و انتقال ترکیبات زیست فعال مانند ویتامین‌ها و مواد مغذی هستند. امولسیون‌ها انواع مختلفی دارند که شامل امولسیون‌های معمولی، نانو امولسیون‌ها، پیکرینگ امولسیون‌ها، امولسیون‌های چند گانه، امولسیون‌های چند لایه، ذرات لیپید جامد و امولسیون‌های با حجم بالای فاز درونی می‌شوند (۱).

امولسیون‌های چندگانه که به آن‌ها امولسیون‌های دوگانه یا امولسیون‌های امولسیون‌ی نیز گفته می‌شود، سیستم‌های چند بخشی هستند که با همزیستی دو امولسیون ساده آب در روغن (W/O) و روغن در آب (O/W) شکل می‌گیرند. متداول‌ترین فرم‌های امولسیون دوگانه شامل سامانه‌های آب در روغن در آب (W/O/W) و روغن در آب در روغن (O/W/O) است. یک سیستم امولسیون W/O/W، متشکل از سه فاز است، دو فاز آبی (بیرونی و درونی) و یک فاز لیپیدی که بین فازهای آبی قرار دارد. از این امولسیون‌ها جهت ریزپوشانی ترکیبات فعال در صنعت غذا، دارو، لوازم آرایشی و صنعت استفاده می‌شود (۲).

ایزوله پروتئین آب پنیر محصول جانبی فرایند پنیرسازی بوده که به دلیل دارا بودن اسیدهای آمینه ضروری، منبع پروتئینی با کیفیت بالا محسوب

می‌شود. این پروتئین به‌طور وسیعی به‌عنوان یک افزودنی کلیدی و کاربردی در انواع محصولات غذایی استفاده می‌شود (۳). محصول تجاری ایزوله پروتئین آب پنیر توسط فیلتراسیون غشایی و خشک کن پاششی تولید شده و شامل پروتئین‌های بتا لاکتوگلوبولین، آلفا لاکتالبومین، سرم آلبومین و لاکتوفرین‌ها می‌باشد (۴ و ۵). پروتئین‌های آب پنیر به‌طور گسترده به‌عنوان بافت دهنده، تثبیت کننده، ژل دهنده، کف کننده، امولسیفایر و همچنین برای تهیه هیدروژل‌ها، نانوذرات، فیلم‌های خوراکی و پوشش‌ها استفاده می‌شوند (۶). ویژگی‌های کاربردی پروتئین‌های آب پنیر ظاهر، طعم، بافت و رفتار رئولوژیکی رضایت بخشی را در محصولات غذایی فراهم می‌سازد.

کاربرد صنعتی ایزوله پروتئین آب پنیر به دلیل کاهش حلالیت، انعقاد و کاهش فعالیت امولسیون کنندگی و توانایی ایجاد امولسیون پایدار در شرایط خاص فرایند مانند قدرت یونی بالا، pH و یا دما محدود می‌شود (۷). برای غلبه بر این محدودیت‌ها، تلاش‌های زیادی برای بهبود یا تغییر عملکرد ایزوله پروتئین آب پنیر با استفاده از روش‌های فیزیکی، شیمیایی و یا آنزیمی صورت گرفته است (۸). با این حال، خطرات سلامتی بالقوه در مورد معرف‌ها و واکنش دهنده‌های مورد استفاده در فرایندهای فوق همچنان به‌عنوان یک نگرانی عمده وجود دارد.

کونژوگ شدن گروه‌های E- آمینو اسیدهای آمینه یا پروتئین‌ها با قندهای احیاکننده بدون استفاده از هیچ ماده شیمیایی دیگر توجه بسیاری از محققین را به‌خود جلب کرده است (۹). مطالعات انجام گرفته در سال‌های اخیر مشخص ساختند که خصوصیات کاربردی ایزوله پروتئین آب پنیر توسط کونژوگ شدن با کریوهدرات‌ها از طریق فرایند میلارد بهبود چشم‌گیری یافته است (۹ و ۱۰). واکنش میلارد بین گروه‌های آمینی آزاد پروتئین‌ها و گروه‌های کربونیل

و بررسی ویژگی‌هایی مانند اندازه قطرات، پتانسیل زتا، ویسکوزیته و پایداری آنها طی مدت زمان نگهداری می‌باشد.

### مواد و روش‌ها

مواد: اینولین از شرکت بنتو (Beneo-Germany) و ایزوله پروتئین آب پنیر از شرکت جرمن پروت (GermanProt-Germany) خریداری شد. سایر مواد شیمیایی از شرکت‌های مرک و سیگما آلدریج تهیه گردید.

#### آماده‌سازی کونژوگه پروتئین- پلی ساکارید در

**شرایط میلارد:** ایزوله پروتئین آب پنیر و اینولین (نسبت‌های ۱:۱، ۲:۱ و ۱:۲) در محلول بافر فسفات (pH=۷) حل شد و با استفاده از همزن مغناطیسی در دمای اتاق به مدت ۲ ساعت مخلوط گردید. سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد تا جذب آب به‌طور کامل انجام شود. در ادامه نمونه‌ها توسط خشک کن انجمادی به پودر تبدیل شدند. پودرهای حاصل به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۶۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۷۹ درصد در آن نگهداری شدند تا واکنش میلارد بین ایزوله پروتئینی آب پنیر و پلی اینولین انجام شود. ایزوله پروتئین آب پنیر به‌عنوان شاهد استفاده گردید. برای تأمین رطوبت نسبی مورد نظر از محلول اشباع پتاسیم برومید استفاده شد (۲۲). پودرهای کونژوگه تا زمان استفاده در ظروف کاملاً در بسته در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جهت اطمینان از وقوع واکنش و نوع اتصالات ترکیبات حاصل از روش طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FT-IR) و الکتروفورز SDS-PAGE استفاده گردید.

**تولید امولسیون‌های دوگانه (W/O/W):** بافر فسفات (pH=۷) (۲۰ درصد وزنی/وزنی) به فاز روغنی (۸۰ درصد وزنی/وزنی) شامل امولسیفایر PGPR، اضافه و

پلی ساکاریدها به وقوع می‌پیوندد (۱۱ و ۱۲). طی این فرایند پیوندهای کووالانسی بین پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌ها در شرایط کنترل شده از لحاظ زمان، حرارت و رطوبت نسبی ایجاد می‌شود. کونژوگه‌های تولید شده در واکنش میلارد تلفیقی از خواص عملکردی پروتئین و کربوهیدرات را داشته و نسبت به شرایط محیطی حساسیت کمتری نشان می‌دهند (۹ و ۱۳). تعدادی از کونژوگه‌های بررسی شده شامل پروتئین گندم - دکستران (۱۴)، ایزوله پروتئین سویا - مالتودکسترین (۱۵)، ایزوله پروتئین نخود- پکتین (۱۶)، ایزوله پروتئین سویا- زایلوز/فروکتوز (۱۷)، کنسانتره پروتئین نخود- صمغ عربی (۱۸)، گلو تن گندم- مالتوز (۱۹) می‌باشند.

اینولین به‌طور گسترده‌ای در بیش از ۳۰۰۰ گیاه مختلف وجود دارد و ویژگی‌های تغذیه‌ای و مزایای تکنولوژیکی قابل توجهی را نشان می‌دهد (۲۰). از دیدگاه تغذیه‌ای و تکنولوژیکی، اینولین را می‌توان به‌عنوان یک بیوپلیمر برجسته به دلیل کاربردهای گسترده آن در صنایع غذایی، دارویی و شیمیایی در نظر گرفت. در صنعت داروسازی، اینولین به‌عنوان یک ماده کمکی در قرص‌ها، واکنش‌ها و ریزپوشانی طیف گسترده‌ای از ترکیبات زیست فعال مشارکت دارد. در صنعت غذا اینولین در مقیاس وسیعی به‌عنوان یک افزودنی سالم در توسعه مواد غذایی استفاده می‌شود و کاربردهای آن به‌عنوان پری‌بیوتیک طبیعی و فیبر رژیمی در حال افزایش است. با این حال کاربرد این پلی ساکارید با عملکردهای فناوری غذایی مرتبط است و به‌عنوان تثبیت‌کننده، جایگزین چربی و بهبوددهنده بافت کاربرد دارد (۲۱).

هدف از این پژوهش تولید کونژوگه‌های میلارد ایزوله پروتئین آب پنیر - اینولین با سه نسبت وزنی ۱:۱، ۲:۱ و ۱:۲ در دماهای ۶۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد، جهت تثبیت و تولید امولسیون‌های دوگانه (W/O/W)

فاصله ثابت ۳۰ سانتی‌متری از نمونه‌ها درون یک جعبه سیاه با نورپردازی زاویه ۴۵ درجه گرفته شد. تصاویر توسط نرم افزار Image J به فضای رنگی  $L^*, a^*, b^*$  تبدیل گردید.  $L^*$  شاخص تیرگی - روشنی است که افزایش آن نشان‌دهنده روشن‌تر بودن و کاهش آن تیرگی را نشان می‌دهد.  $a^*$  شاخص قرمز - سبز نامیده می‌شود که هرچه بیشتر باشد، نشان‌دهنده قرمزی و با کاهش آن رنگ سبزتر می‌شود.  $b^*$  شاخص زرد-آبی است که هر چه بیشتر باشد نشان‌دهنده زردی و هرچه کمتر باشد نشان‌دهنده آبی بودن است.

**تعیین اندازه قطرات و پتانسیل زتا امولسیون‌های دوگانه (W/O/W):** تعیین اندازه قطرات امولسیون توسط دستگاه زتاسایزر (مالورن - انگلستان) انجام گرفت.

**سنجش ویسکوزیته امولسیون‌های دوگانه (W/O/W):** ویسکوزیته امولسیون‌های تولیدی توسط ویسکومتر چرخشی بروکفیلد در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد با استفاده از اسپیندل S00 انجام گرفت.

**شاخص خامه‌ای شدن امولسیون‌های دوگانه (W/O/W):** پایداری نمونه‌ها از طریق مشاهده ظاهری آن‌ها طی ۲۱ روز نگهداری در دمای محیط تعیین گردید (۱۳). شاخص خامه‌ای شدن مطابق با رابطه ۱ تعیین شد:

$$\text{ارتفاع لایه سرم} = \text{شاخص خامه‌ای شدن (درصد)} / 100 \times (\text{ارتفاع کل امولسیون})$$

### روش آماری

به منظور آنالیز داده‌ها و بررسی اطلاعات از طرح کاملاً تصادفی استفاده شد. جهت تعیین اختلاف میانگین داده‌ها پس از آنالیز واریانس با روش ANOVA، از آزمون چند دامنه دانکن در سطح ۵ درصد استفاده گردید. در تمامی مراحل تجزیه و تحلیل آماری نتایج با

هموزن‌سازی توسط هموزنایزر (۶ دقیقه، ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه) و سپس هموزنایزر فراصوت (۴۰۰ کیلوهرتز، ۵ دقیقه) انجام شد. جهت تشکیل فاز آبی خارجی امولسیون‌ها، پودرهای کونژوگه ایزوله پروتئین آب پنیر - اینولین در بافر فسفات (pH=۷) حل شدند. محلول‌های حاصل به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید تا جذب آب به صورت کامل صورت پذیرد. سپس امولسیون (W/O) (۱۰ درصد وزنی/وزنی) به محلول‌های کلوئیدی اضافه و همگن‌سازی توسط دستگاه هموزنایزر (۴ دقیقه، ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه) انجام گرفت (۲۲).

**الکتروفورز ژل پلی‌آکریل آمید (SDS-PAGE):** الکتروفورز ژل پلی‌آکریل آمید تحت شرایط دناتوره با روش لاملی انجام گرفت. از ژل جداکننده ۱۵ درصد و ژل متراکم کننده ۵ درصد استفاده شد. الکتروفورز با ولتاژ ۵۰ ولت در ژل متراکم کننده به مدت نیم ساعت و با ولتاژ ۱۱۰ ولت در ژل جداکننده به مدت ۳ ساعت انجام شد. رنگ آمیزی ژل با کوماسی بریلیانت بلو و رنگبری ژل‌ها نیز توسط محلول رنگ‌بر (اسید استیک، متانول و آب مقطر) انجام گرفت (۲۳).

**طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون‌قرمز (FT-IR):** تعیین پیشرفت کونژوگه شدن و بررسی ساختار ترکیبات حاصل با کمک روش FT-IR انجام شد. جهت آماده‌سازی برای آنالیز طیف سنجی، یک میلی‌گرم از نمونه با ۱۰۰ میلی‌گرم برمید پتاسیم مخلوط و در هاون سابیده شد تا مخلوط کاملاً همگن به دست آید. سپس مخلوط در دستگاه قرص‌ساز ریخته و به صورت قرص آماده گردید. طیف حاصل از نمونه‌ها در محدوده عدد موج  $4000$  تا  $400$   $\text{cm}^{-1}$  بررسی شد (۲۴).

**بررسی رنگ:** برای تصویربرداری از کونژوگه‌ها از دوربین دیجیتال کانن استفاده شد. تصاویر از یک

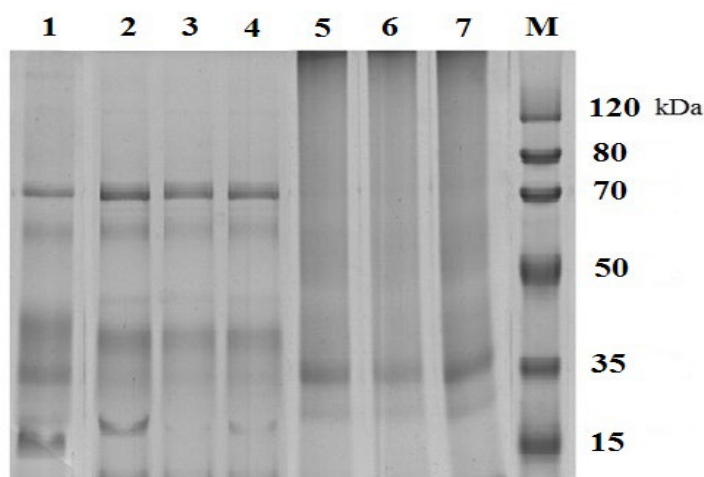
۱۸ و ۷۰ کیلودالتون به ترتیب نشان دهنده پروتئین‌های آلفا لاکتالبومین، بتا لاکتوگلوبولین و سرم آلبومین در نمونه ایزوله پروتئین آب پنیر می‌باشد (۲۲).

با اعمال دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد باندهای پروتئین ایزوله پروتئین آب پنیر تمایل به از بین رفتن دارند و اتصالات جدیدی تشکیل می‌شود. تشکیل کونژوگه‌ها منجر به کاهش شدت باندها نسبت به پروتئین خالص گشته و به جای آن نواری ظاهر می‌گردد که نمایانگر اتصالات کووالانسی بین ایزوله پروتئینی آب پنیر و اینولین و تشکیل ترکیبات با وزن مولکولی بالاتر است (۹). با افزایش درجه حرارت انکوباسیون (۸۰ درجه سانتی‌گراد)، درجه کژوگه شدن افزایش یافته و ترکیبات با وزن مولکولی بیشتر تشکیل می‌شوند. با توجه به ساختار پلیمری اینولین، کونژوگه‌های تشکیل شده با ایزوله پروتئین آب پنیر توزیع وزن مولکولی گسترده‌ای را نشان می‌دهند. این امر در خطوط ۵ الی ۷ قابل مشاهده بوده و نشان دهنده گلیکوزیله شدن ایزوله پروتئین آب پنیر و اینولین و تولید ترکیبات با وزن مولکولی بالا است.

استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS 16 انجام شد. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده گردید. تمامی آزمون‌ها در ۳ تکرار انجام شد.

### نتایج و بحث

الکتروفورز ژل پلی‌آکریل آمید (SDS-PAGE): به منظور تأیید و بررسی تشکیل ترکیبات با وزن مولکولی بالا که نشانه کونژوگه شدن ایزوله پروتئین آب پنیر و اینولین در حین فرایند میلارد می‌باشد، الکتروفورز انجام شد. در واقع با این روش تشکیل پیوندهای کووالانسی بین ایزوله پروتئین آب پنیر و اینولین تأیید می‌شود. همان‌طور که در شکل ۱ مشخص است خط ۱ نشان‌دهنده ایزوله پروتئین آب پنیر، خطوط ۲-۴ کونژوگه‌های ایزوله پروتئین آب پنیر - اینولین (۱:۱، ۱:۲ و ۲:۱) تولید شده در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد، خطوط ۵-۷ کونژوگه‌های ایزوله پروتئین آب پنیر - اینولین (۱:۱، ۱:۲ و ۲:۱) تولید شده در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد و خط M نیز مارکر را مشخص می‌نماید. باندهای قابل مشاهده در محدوده ۱۴/۴،



شکل ۱- پروفایل الکتروفورز SDS-PAGE ایزوله پروتئین آب پنیر (خط ۱)، کونژوگه ایزوله پروتئین آب پنیر - اینولین تولید شده در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد (نسبت‌های ۱:۱، ۱:۲ و ۲:۱) (خطوط ۲-۴) کونژوگه ایزوله پروتئین آب پنیر - اینولین تولید شده در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد (نسبت‌های ۱:۱، ۱:۲ و ۲:۱) (خطوط ۵-۷) و مارکر (M).

Figure 1. SDS-PAGE of WPI native (1); WPI - Inulin (1:1, 60°C) (2); WPI - Inulin (1:2, 60°C) (2); WPI - Inulin (2:1, 60°C) (4); WPI - Inulin (1:1, 80°C) (5); WPI - Inulin (1:2, 80°C) (6); WPI - Inulin (2:1, 80°C) (7) and marker (M).

گروه‌های  $C=O$  و  $N-H$  پیوندهای پپتیدی را مشخص می‌نماید (۳۲). نتایج نشان داد که با کونژوگه شدن ایزوله پروتئین آب پنیر و اینولین عدد موجی این پیک تغییر و افزایش یافته است. میزان افزایش طول موج این پیک در کونژوگه‌های تولیدی در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد بیشتر از کونژوگه‌های تولیدی در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد بود. این تغییرات تأثیر پارامتر دما را بر تعاملات بیوپلیمری مشخص می‌سازد. منطقه امید نوع اول نسبت به تغییرات کنفورماسیونی ساختار ثانویه پروتئین‌ها که شامل باندهای هیدروژنی صفحات بتای پروتئین‌های تجمع یافته است، حساس می‌باشد (۳۳) و عواملی مانند دما و تغییرات نسبت پروتئین به پلی‌ساکارید منجر به تغییرات عدد موجی این پیوندها می‌گردد؛ به طوری که پیک نمونه‌های کونژوگه تولیدی با نسبت ۲ به ۱ ایزوله پروتئین آب پنیر به اینولین در عدد موجی پائین‌تری قرار دارند. البته دما علاوه بر موقعیت بر شدت پیک‌های ناحیه امید نوع اول نیز تأثیرگذار بوده است، به طوری که کونژوگه‌های تولیدی در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد پیک‌های تیزتری در این ناحیه نشان دادند. حرارت باعث تغییرات در ساختار ثانویه پروتئین‌ها می‌شود و در نتیجه سبب تغییرات مکانی و شدت پیک‌ها می‌گردد (۳۴). شکل پیک موجود در عدد موجی ۱۶۳۰ که نمایانگر تجمع کامل پروتئین است از نظر ویژگی‌های ساختار ثانویه مهم است، به طوری که یک پیک صاف در ناحیه امید نوع اول به معنای ساختار ثانویه بی‌نظم‌تر می‌باشد (۳۲).

پیک ۱۵۱۵ ایزوله پروتئین آب پنیر عمدتاً مرتبط با ارتعاشات خمشی  $N-H$  و به طور جزئی‌تر مرتبط با ارتعاشات کششی  $C-N$  باندهای پپتیدی بوده و به ناحیه امید نوع دوم معروف است (۳۲ و ۳۵). پیک مرتبط با امید نوع دوم بعد از کونژوگه شدن ایزوله پروتئین آب پنیر و اینولین به سمت عدد موجی بالاتر منتقل گردید. به طور کلی کونژوگه‌های تولید شده در

اشمیت و همکاران (۲۰۱۶) نیز این امر را در مورد کونژوگه‌های ایزوله پروتئین آب پنیر و پکتین گزارش دادند (۲۲). از لحاظ نسبت‌های وزنی متفاوت ایزوله پروتئین آب پنیر - اینولین تفاوتی بین الگوی باندها مشاهده نشد. نتایج مشخص ساخت که پارامتر دما بسیار تأثیرگذارتر از پارامتر نسبت وزنی پروتئین - پلی‌ساکارید در پروفایل الکتروفورز است.

**طیف‌سنج مادون قرمز تبدیل فوریه (FT-IR):**  
طیف‌سنجی FT-IR یک تکنیک سریع و کاربردی مفید برای مطالعه ساختار و برهمکنش‌های سیستم‌های پروتئین - پلی‌ساکاریدی است. زمانی که گروه‌های عاملی در سطح مولکولی واکنش می‌دهند، تغییرات طیف FT-IR مانند ظهور باندهای جدید و تغییرات شدت و مکان باندهای جذب، قابل مشاهده است (۲۶). برای بررسی ویژگی‌های کونژوگه‌های واکنش میلارد نیز می‌توان از این تکنیک استفاده نمود (۲۷).

شکل ۲ پروفایل طیف‌سنج مادون‌قرمز تبدیل فوریه نمونه‌ها را نشان می‌دهد. پیک موجود در طول موج ۱۰۳۴ اینولین را می‌توان به ارتعاشات کششی حلقه تتراهیدروپوران فروکتوز  $C-O$  و ارتعاشات کششی  $C-C$  حلقه پیرانوز نسبت داد (۲۸ و ۲۹). بعد از کونژوگه شدن ایزوله پروتئین آب پنیر - اینولین شدت و عدد موجی این پیک تغییر یافته است، به طوری که با افزایش دمای انکوباسیون، پیک به عدد موجی پایین‌تر منتقل شده و شدت آن نیز افزایش یافته است. این پیک در کونژوگه‌های تولیدی در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد کمترین طول موج را نشان داد و همچنین تیزترین پیک را داشت.

پیک در طول موج ۱۶۳۰ ایزوله پروتئین آب پنیر نشان‌گر ناحیه امید نوع اول بوده که عمدتاً ناشی از ارتعاشات کششی پیوند  $C=O$  و به طور جزئی ارتعاشات کششی  $C-N$  و خمشی  $N-H$  است (۳۰) و (۳۱). این باند ماهیت پیوندهای هیدروژنی درگیر با

دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد در هر سه نسبت بیشترین عدد موجی را نشان دادند. این امر مشخص می‌نماید که ساختار صفحات بتای پروتئین کاهش یافته و ساختار پروتئین بیشتر کشیده می‌شود (۳۶). با افزایش دمای انکوباسیون به‌خصوص در کونژوگه‌های تولید شده در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد، شدت پیک افزایش می‌یابد. افزایش شدت طیف این ناحیه ممکن است به دلیل هیدرولیز باندهای پپتیدی باشد (۳۲). مقدار جابه‌جایی پیک به طول موج‌های بالاتر در نسبت ۱:۲ ایزوله پروتئین آب پنیر به اینولین بیشتر بوده که این امر مرتبط با افزایش مقدار اینولین است و می‌تواند با پروتئین، بدون تأثیر بر بازشدگی آن پیوند دهد.

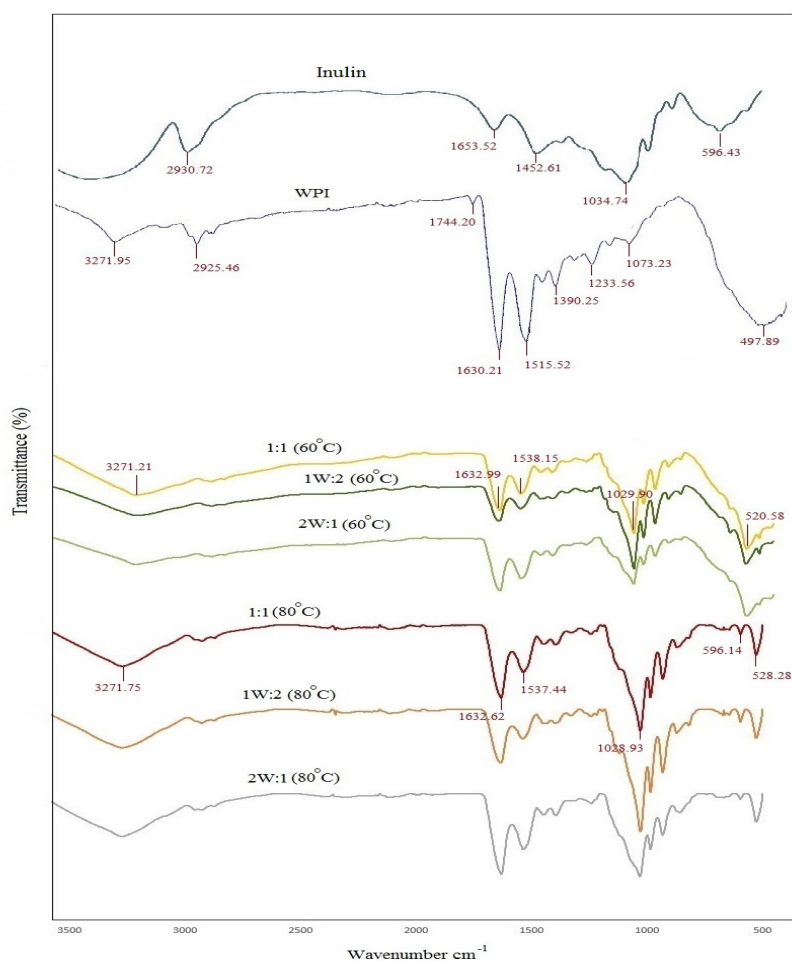
به‌عنوان یک قاعده کلی، تشکیل پیوندهای هیدروژنی، پتانسیل افزایش عدد موجی ارتعاش خمشی N-H را دارند (۳۰). کاهش برخی از گروه‌های عملکردی ملنند  $\text{NH}_2$  ایزوله پروتئین آب پنیر و تشکیل گروه‌های جدید مانند ترکیبات آمادوری ( $\text{C}=\text{O}$ ) باز شیف ( $\text{C}=\text{N}$ ) و پیرازین‌ها ( $\text{C}-\text{N}$ ) ممکن است طی فرایند میلارد انجام شود. ارتعاشات این گروه‌های جدید و بلندهای C-O، N-H و C-H گروه آمیدی در محدوده ۱۸۰۰-۸۰۰ جذب دارند (۳۷). همچنین پیک موجود در عدد موجی ۲۹۲۵ مربوط به کشش نامتقارن متیلن  $\text{CH}_2$  ایزوله پروتئین آب پنیر است (۳۵ و ۳۸). اینولین نیز در عدد موجی ۲۹۳۰ پیکی را نشان داد که معرف پیوند کششی C-H در ساختار اینولین است (۳۹). بعد از کونژوگه شدن ایزوله پروتئین آب پنیر و اینولین موقعیت و شدت این دو باند بسیار کاهش یافت که این امر ممکن است به دلیل تعاملات بین مولکولی باشد که سبب می‌گردد ارتعاشات متیلن کاهش یابد. این نتایج با یافته‌های

دونگ و همکاران (۲۰۲۰) مطابقت داشت که گزارش دادند که بعد از مخلوط و کونژوگه شدن صمغ بذرکتان و ایزوله پروتئین آب پنیر شدت این پیک کاهش یافته است (۳۸).

پیک موجود در طول موج ۳۲۷۱ معرف ارتعاشات گروه هیدروکسیل آزاد و باند شده با گروه N-H و O-H ایزوله پروتئین آب پنیر است (۳۱ و ۳۵). این پیک بعد از کونژوگه شدن نمونه‌ها در محدوده ۳۲۷۲-۳۲۷۰ قرار گرفت و شدت آن با افزایش دمای انکوباسیون نمونه‌ها افزایش یافته است. تشکیل پیوند هیدروژنی بین مولکولی گروه کربونیل با باندهای پپتیدی در افزایش این پیک موثر است (۳۲).

پیک موجود در طول موج ۱۶۵۳ نشان‌دهنده اسید کربوکسیلیک نامتقارن اینولین است (۳۹). این پیک‌ها بعد از کونژوگه شدن ایزوله پروتئین آب پنیر و اینولین قابل شناسایی نیستند. این امر نشان‌دهنده تعاملات بین پروتئین و پلی ساکارید است و ظرفیت کمتر مولکول‌های کربوهیدرات برای ایجاد پیوندهای هیدروژنی بین مولکولی درون کربوهیدراتی در حضور پروتئین را مشخص می‌نماید (۴۰).

پیک موجود در عدد موجی ۱۳۹۰ مرتبط با آنیون کششی متقارن  $\text{COO}^-$  یا  $\text{CH}_3$  در ساختار ایزوله پروتئین آب پنیر است (۳۱ و ۴۱). بعد از کونژوگه شدن ایزوله پروتئین آب پنیر و اینولین پیک جله‌جا شده و شدت آن نیز کاهش یافته است. شدت این کاهش در نسبت ۲:۱ اینولین- ایزوله پروتئین آب پنیر بیشتر است. در واقع با افزایش غلظت ایزوله پروتئین آب پنیر تشکیل باندهای هیدروژنی درون و بین مولکولی افزایش می‌یابد. تشکیل باندهای هیدروژنی فرکانس ارتعاشات کششی را کاهش می‌دهد، به این جهت که سبب کاهش نیروی بازجایی می‌شود (۳۰).



شکل ۲- پروفایل طیف‌سنج مادون‌قرمز تبدیل فوریه اینولین (Inulin)، ایزوله پروتئین آب پنیر (WPI)، کونژوگه ایزوله پروتئین آب پنیر - اینولین تولید شده در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد (نسبت‌های ۱:۱، ۲:۱ و ۲:۱)، کونژوگه ایزوله پروتئین آب پنیر - اینولین تولید شده در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد (نسبت‌های ۱:۱، ۲:۱ و ۲:۱).

Figure 2. FTIR spectra of Inulin, WPI and WPI-Inulin conjugates (60 and 80°C).

واکنش بیشتری داده و فعل و انفعالات آبگریز- آبگریز و پیوندهای دی سولفید - سولفیدریل افزایش می‌یابد. تشکیل توده‌های با اندازه بزرگتر منجر به انعکاس بیشتر نور و افزایش میزان  $L^*$  می‌گردد. نصرالله زاده و همکاران (۲۰۱۷) گزارش دادند که با افزایش زمان انکوباسیون کونژوگه مالتودکسترین- آلبومین سرم گاوی اندیس  $L^*$  افزایش یافته است (۴۲).

از آنجا که واکنش میلارد یک واکنش قهوه‌ای شدن غیرآنزیمی است، اندازه‌گیری تغییرات رنگی می‌تواند با حضور ترکیبات شکل گرفته در طول فرایند مرتبط

ویژگی‌های رنگی: جدول ۱ تغییرات رنگی ایزوله پروتئین آب پنیر- اینولین را در حالت کونژوگه نشان می‌دهد.  $L^*$  نشان دهنده روشنایی نمونه‌ها در محدوده صفر (سیاه) تا ۱۰۰ (سفید) است. این پارامتر مرتبط با توانایی نمونه‌ها در انعکاس و پخش نور است (۴۲). با مقایسه این شاخص در نمونه ایزوله پروتئین آب پنیر و کونژوگه‌های ایزوله پروتئین آب پنیر- اینولین مشخص شد که انکوباسیون نمونه‌ها و انجام واکنش میلارد سبب افزایش شاخص  $L^*$  شده است. با افزایش دما و شدت یافتن واکنش میلارد مولکول‌های پروتئین

کونژوگه با افزایش دمای واکنش و شدت یافتن واکنش میلارد تفاوت معنی داری را نشان می‌دهد، ( $p < 0.05$ ) که مطابق با نتایج الکتروفورز است. سایر محققین نیز گزارش دادند که تشکیل کونژوگه با افزایش مقادیر  $b^*$  قابل تایید است (۴۳ و ۴۵). با افزایش دمای انکوباسیون مقادیر  $a^*$  نیز افزایش یافت که به دلیل افزایش واکنش میلارد می‌باشد. لیو و زونگ (۲۰۱۵) افزایش مقادیر  $a^*$  و  $b^*$  را در پی افزایش واکنش میلارد در کونژوگه‌های ایزوله پروتئین آب پنیر - لاکتوز و ایزوله پروتئین آب پنیر - مالتو دکسترین گزارش دادند (۴۶).

باشد (۴۳). شاخص  $a^*$  نشان دهنده رنگ قرمز - سبز ( $+a = \text{قرمز}$  و  $-a = \text{سبز}$ ) و  $b^*$  نشان دهنده زرد - آبی ( $+b = \text{زرد}$  و  $-b = \text{آبی}$ ) می‌باشند. مقادیر  $b^*$  نشان‌دهنده رنگ زرد کونژوگه‌ها در اثر واکنش میلارد است (۴۴).

در رطوبت نسبی ۷۹٪، زمان ۲۴ ساعت و دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد مقدار  $b^*$  نمونه‌ها با سه غلظت وزنی متفاوت از ایزوله پروتئین آب پنیر - اینولین در محدوده ۹/۸۳ - ۵/۲۳ و در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد مقادیر این شاخص در محدوده ۲۵/۳۷ - ۲۲/۴۲ قرار گرفت. نتایج نشان دادند که مقادیر  $b^*$  نمونه‌های

جدول ۱- ویژگی‌های رنگی ایزوله پروتئین آب پنیر و کونژوگه‌های ایزوله پروتئین آب پنیر - اینولین

Table 1- Color features of WPI and WPI-Inulin conjugates

SAMPLES	L*	A*	B*
1:1 (CO 60° C)	86.82±0.04 <sup>d</sup>	-6.39±0.05 <sup>e</sup>	6.45±0.05 <sup>F</sup>
1w:2 (CO 60° C)	86.50±0.05 <sup>e</sup>	-5.76±0.02 <sup>f</sup>	5.23±0.04 <sup>G</sup>
2w:1 (CO 60° C)	86.97±0.04 <sup>c</sup>	-8.37±0.04 <sup>b</sup>	9.83±0.04 <sup>D</sup>
1:1 (CO 80° C)	87.41±0.07 <sup>a</sup>	-6.58±0.02 <sup>d</sup>	25.37±0.07 <sup>A</sup>
1w:2 (CO 80° C)	87.45±0.07 <sup>a</sup>	-8.10±0.04 <sup>c</sup>	22.42±0.05 <sup>C</sup>
2w:1 (CO 80° C)	87.19±0.05 <sup>b</sup>	-9.69±0.05 <sup>a</sup>	25.18±0.08 <sup>B</sup>
WPI	87.25±0.04 <sup>b</sup>	-8.08±0.05 <sup>c</sup>	9.22±0.05 <sup>E</sup>

اینولین تولید شده در دمای ۶۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد در جدول ۲ مشخص شده است. متوسط اندازه قطرات امولسیون‌های تثبیت شده با کونژوگه‌های تولید شده در دمای ۶۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد در روز نخست تولید به ترتیب در محدوده ۶۰۰/۶ تا ۶۳۰/۲ نانومتر و ۴۸۹/۴ تا ۵۴۰/۶ نانومتر قرار داشت. ویژگی‌های سطحی کونژوگه‌ها موجب تفاوت اندازه قطرات امولسیون‌ها می‌گردد. دلفانیان و همکاران (۲۰۱۸) اندازه قطرات امولسیون دوگانه (W/O/W) تثبیت شده با ایزوله پروتئین آب پنیر - صمغ دانه ریحان را ۷۳۶/۹ نانومتر گزارش دادند (۵۴).

شاخص اندازه قطرات امولسیون‌های دوگانه (W/O/W): اندازه قطرات امولسیون‌ها مهم‌ترین پارامتر برای تکنولوژی امولسیون است، زیرا بر ظاهر، پایداری، بافت، مدت نگهداری و طعم امولسیون تاثیر دارد (۴۷). کونژوگه‌های پروتئین - پلی ساکارید موجب بهبود فعالیت امولسیون‌کنندگی و پایداری فیزیکی فیلم سطحی تشکیل شده اطراف قطرات روغن می‌شوند و در نتیجه منجر به تشکیل قطراتی با اندازه کوچک‌تر می‌گردند (۴۸).

اندازه قطرات امولسیون‌های دوگانه (W/O/W) تثبیت شده با کونژوگه‌های ایزوله پروتئین آب پنیر -

پاگانو و همکاران (۲۰۱۸) کاهش اندازه امولسیون‌های دوگانه (W/O/W) را با کاهش ویسکوزیته مرتبط دانستند (۵۱). نتایج بررسی ویسکوزیته امولسیون‌ها مشخص ساخت که امولسیون‌های دوگانه تثبیت شده با نسبت ۲:۱ کونژوگه ایزوله پروتئین آب پنیر - اینولین دارای ویسکوزیته کمتری نسبت به سایر امولسیون‌ها بودند. ویسکوزیته فازهای روغن و آب می‌تواند اندازه نهایی قطرات امولسیون را تحت تأثیر قرار دهد، این رابطه می‌تواند پیچیده باشد و به ویژگی‌های سامانه (فرمولاسیون و فرایند) بستگی دارد (۵۲).

اندازه قطرات امولسیون‌ها به تعادل بخش‌های آب‌دوست - چربی‌دوست امولسیفایر نیز بستگی دارد. پیوندهای کووالانسی ایجاد شده بین کونژوگه‌های حاصل از میلارد، بخش‌های آب‌دوست - چربی‌دوست ساختار هیبرید پروتئین - پلی ساکارید را اصلاح می‌نماید، این پدیده نیز ممکن است در کاهش اندازه قطرات امولسیون‌ها دخیل باشد (۵۳).

شاخص PDI پراکندگی اندازه قطرات را مشخص می‌کند و نقش مهمی در پایداری امولسیون دارد (۵۵). توزیع اندازه قطرات یک امولسیون بر ویژگی‌های رئولوژیکی، خامه‌ای شدن و بازده ریزپوشانی تأثیر دارد (۴۹). مقادیر PDI کوچکتر از ۰/۷ نشان‌دهنده این است که نمونه دارای توزیع اندازه قطرات همگن‌تری است (۵۶). همانطور که در جدول ۲ مشخص است، شاخص چند پراکندگی نمونه‌ها در روز اول تولید در محدوده ۰/۴۰۳ - ۰/۴۷۵ و در روز آخر نگهداری در محدوده ۰/۴۳۰ - ۰/۴۹۰ قرار گرفت.

متوسط اندازه قطرات امولسیون‌های تثبیت شده با کونژوگه‌های تولیدشده در ده‌ای ۶۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد طی مدت زمان نگهداری افزایش داشت؛ به طوری که در روز آخر (۲۱ ام) به ترتیب در محدوده ۶۲۲/۶ تا ۶۷۵/۲ نانومتر و ۵۱۹/۴ تا ۵۷۰/۶ نانومتر قرار گرفت. اندازه قطرات به فاکتورهای زیادی مانند نوع و غلظت امولسیفایرها، نسبت حجم فازها، ویژگی‌های سطحی، ویسکوزیته و ترکیب فازهای مختلف بستگی دارد (۴۹).

نتایج نشان داد که بعد از ۲۱ روز نگهداری امولسیون‌های دوگانه (W/O/W) در ده‌ای محیط، اندازه قطرات امولسیون‌ها افزایش یافته که این پدیده را می‌توان به رسیدن استوالد و کوالسنس مرتبط دانست. موتالیوا و همکاران (۲۰۱۶) نیز گزارش دادند که اندازه قطرات امولسیون دوگانه (W/O/W) تثبیت شده با کیتوزان و صمغ زانتان طی مدت زمان نگهداری افزایش یافته است که تأیید می‌کند در سیستم رسیدن استوالد رخ داده است (۵۰). چن و همکاران (۲۰۱۹) نیز افزایش اندازه امولسیون دوگانه (W/O/W) تثبیت شده با کونژوگه ایزوله پروتئین آب پنیر - اپی گالوکاتچین ۳ گالات طی مدت زمان نگهداری را به پدیده‌های کوالسنس و رسیدن استوالد نسبت دادند (۷).

امولسیون‌های تثبیت شده با نسبت ۲:۱ و ۱:۲ کونژوگه ایزوله پروتئین آب پنیر - اینولین به ترتیب کمترین و بیشترین اندازه قطرات را در روز نخست و بعد از ۲۱ روز نگهداری نشان دادند ( $p < 0.05$ ). با افزایش غلظت اینولین لایه ضخیم‌تری در اطراف قطرات امولسیون تشکیل می‌گردد که این پدیده منجر به افزایش اندازه قطرات می‌شود.

جدول ۲- متوسط اندازه قطرات و شاخص پراکنندگی قطرات امولسیون‌های دوگانه (W/O/W) تثبیت شده با کونژوگه‌های تولیدی در دمای ۶۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد

Table 2. The average particle size and PDI of emulsions stabilized by WPI-Inulin conjugates on day 1 and day 21

Samples (W/O/W)	PDI (day1)	PDI (day21)	Z-Average (nm) day1	Z-Average (nm) day 21
1:1 (CO 60° C)	0.469	0.471	619.8±1.63 <sup>b</sup>	634.5±1.22 <sup>b</sup>
1w:2 (CO 60° C)	0.453	0.468	630.2±3.29 <sup>a</sup>	675.2±1.58 <sup>a</sup>
2w:1 (CO 60° C)	0.475	0.490	600.6±2.51 <sup>c</sup>	622.6±1.96 <sup>c</sup>
1:1 (CO 80° C)	0.443	0.456	500.9±2.27 <sup>e</sup>	539.1±1.13 <sup>e</sup>
1w:2 (CO 80° C)	0.403	0.430	540.6±1.34 <sup>d</sup>	570.6±2.02 <sup>d</sup>
2w:1 (CO 80° C)	0.460	0.479	489.4±1.65 <sup>f</sup>	519.4±1.85 <sup>f</sup>

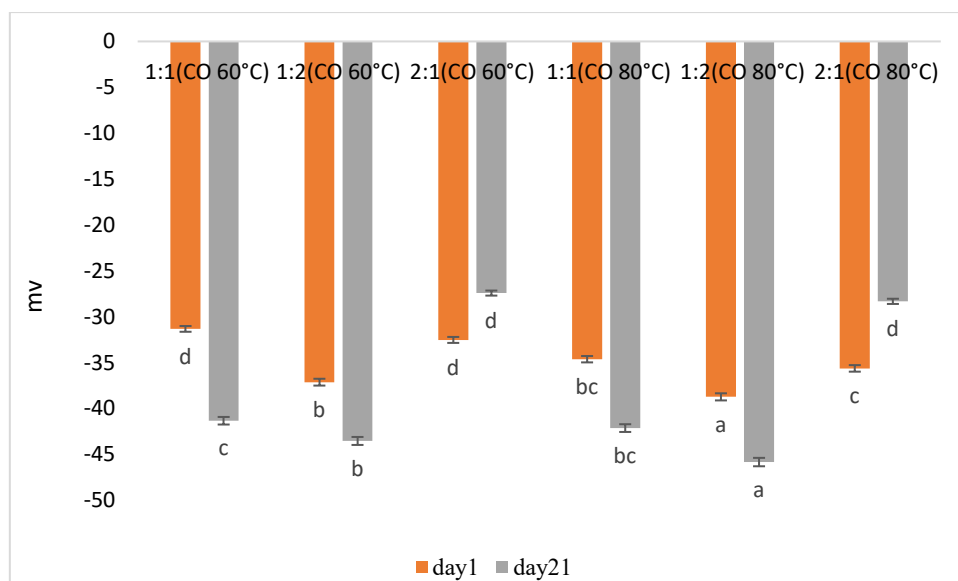
پتانسیل زتا به میزان قابل توجهی تحت تأثیر نوع و مقدار (درصد) امولسیفایر آب دوست مورد استفاده در ساختار امولسیون‌ها قرار دارد (۱۶). امولسیون‌های تثبیت شده با کونژوگه‌های انکوبه شده در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد پتانسیل زتا منفی بیشتری نسبت به امولسیون‌های تثبیت شده با کونژوگه‌های انکوبه شده در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد در نسبت‌های یکسان وزنی پروتئین - پلی ساکارید در روز نخست تولید نشان دادند ( $p < 0.05$ ) که این پدیده می‌تواند به تأثیر دمای بالاتر بر پیوندهای کووالانسی بین ایزوله پروتئین آب پنیر - لینولین و سطوح هیبرید پروتئین - پلی ساکاریدی مرتبط باشد که مقادیر گروه‌های قابل یونیزه آزاد را افزایش می‌دهد. واکنش غیرآنزیمی میلارد می‌تواند منجر به تشکیل تعداد بیشتری از گروه‌های هیدروفیل با بار منفی (کربوکسیل و هیدروکسیل) شود (۴۴) و از آنجا که شدت واکنش طبق نتایج پروفایل الکتروفورز در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد بیشتر از ۶۰ درجه سانتی‌گراد بوده است، می‌توان انتظار داشت تعداد گروه‌های باردار منفی بیشتری در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد تولید شده باشد.

پتانسیل زتا ذرات امولسیون‌های دوگانه (W/O/W): بار سطحی ذرات که معمولاً به‌عنوان پتانسیل زتا نامیده می‌شود، برهم‌کنش‌های احتمالی قطرات امولسیون را تا حد زیادی کنترل کرده و بنابراین به ثبات کلی سیستم کمک می‌نماید (۵۴). نتایج (شکل ۳) مشخص ساخت که پتانسیل زتا همه امولسیون‌های تولید شده منفی است که نشان دهنده بار منفی قطرات امولسیون است. پتانسیل زتا امولسیون‌های دوگانه (W/O/W) تثبیت شده با کونژوگه‌های تولیدشده در دمای ۶۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد در روز نخست تولید در محدوده ۳۱/۳- تا ۳۷/۱- و ۳۴/۶- تا ۳۸/۷- میلی ولت قرار گرفت.

امولسیون‌های تثبیت شده با نسبت ۱:۲ کونژوگه ایزوله پروتئین آب پنیر - اینولین که در دمای ۶۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد تولید شده بودند، مقدار بار منفی بیشتری را در روز نخست و بعد از ۲۱ روز نگهداری نشان دادند. نتایج بررسی پایداری امولسیون‌های دوگانه (W/O/W). نیز مشخص ساخت این امولسیون‌ها پایداری بهتری نسبت به سایر امولسیون‌ها طی زمان نگهداری داشتند.

مدت نگهداری کاهش یافت که این تغییرات مرتبط با پدیده‌های لخته شدن و ادغام هستند که در نتیجه بار سطحی امولسیفایرها را کاهش می‌دهند اما پتانسیل زتا امولسیون‌های تثبیت شده با نسبت‌های ۱:۱ و ۱:۲ کونژوگه ایزوله پروتئین آب پنیر - اینولین تولیدی در دمای ۶۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد بعد از طی شدن زمان نگهداری افزایش یافت.

پس از طی شدن زمان نگهداری، پتانسیل زتا امولسیون‌های دوگانه تثبیت شده با کونژوگه‌های تولیدشده در دمای ۶۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد به ترتیب در محدوده  $-27/4$  تا  $-43/5$  و  $-28/3$  تا  $-45/8$  میلی ولت قرار گرفت. نتایج نشان داد که پتانسیل زتا امولسیون‌های دوگانه تثبیت شده با نسبت ۲:۱ کونژوگه ایزوله پروتئین آب پنیر - اینولین تولیدی در دمای ۶۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد بعد از طی شدن



شکل ۳- مقادیر پتانسیل زتا امولسیون‌های دوگانه (W/O/W) تثبیت شده با کونژوگه‌های تولیدی در دمای ۶۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد

Figure 3. The zeta potential of emulsions stabilized by WPI-Inulin conjugates on day 1 and day 21

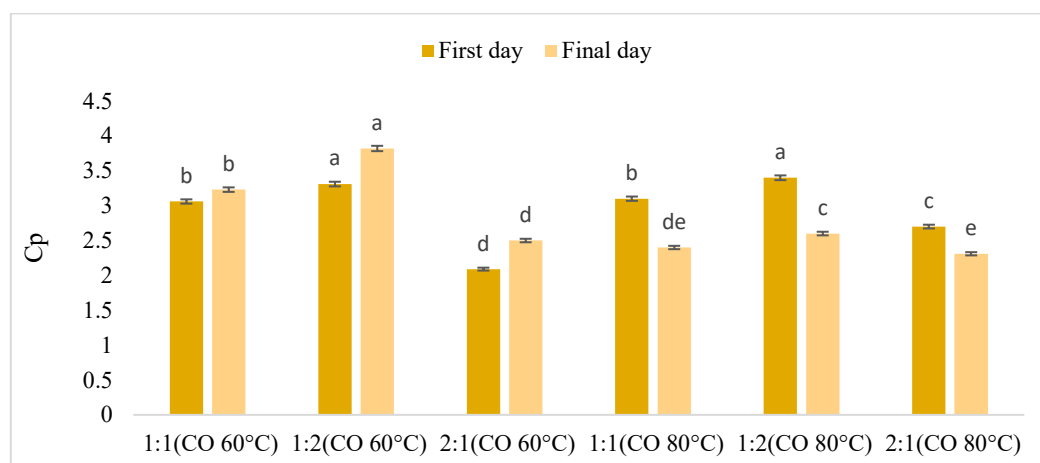
( $P > 0/05$ ). این امر مشخص می‌سازد که افزایش دمای انکوباسیون کونژوگه‌ها نمی‌تواند تأثیر معنی‌داری بر ویسکوزیته امولسیون‌های تازه تولید شده با نسبت‌های ۱:۱ و ۱:۲ داشته باشد و نقش نسبت‌های پروتئین - پلی ساکارید بارزتر از تأثیرات دما می‌باشد. اما امولسیون تثبیت شده با کونژوگه ایزوله پروتئین آب پنیر - اینولین ۲:۱، تولیدشده در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد، ویسکوزیته بیشتری نسبت به امولسیون تثبیت شده با کونژوگه ایزوله پروتئین آب پنیر - اینولین ۲:۱ تولیدشده در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد نشان داد ( $P < 0/05$ ) که می‌تواند به سبب تولید پلیمرهایی با

ویسکوزیته امولسیون دوگانه (W/O/W): ویسکوزیته امولسیون‌ها در سرعت برشی  $110 \text{ s}^{-1}$  اندازه‌گیری و در شکل ۴ مشخص شده است. ویسکوزیته امولسیون‌های تثبیت شده با کونژوگه‌های ایزوله پروتئین آب پنیر - اینولین تولید شده در دمای ۶۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد در روز نخست تولید به ترتیب در محدوده  $2/09$  تا  $3/31$  سانتی پواز و  $2/7$  تا  $3/4$  سانتی پواز قرار داشت. در روز نخست، ویسکوزیته امولسیون‌های تثبیت شده با کونژوگه‌های تولیدی در دمای ۶۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد با نسبت‌های ۱:۱ و ۱:۲ ایزوله پروتئین آب پنیر - اینولین تفاوت معنی‌داری را نشان ندادند

روز نگهداری در دمای محیط افزایش یافت ( $P < 0/05$ ) و در محدوده ۲/۵ تا ۳/۸۲ سانتی پواز قرار گرفت. این پدیده می‌تواند به علت افزایش ضخامت لایه‌های سطحی در اثر جذب پلیمرهای کونژوگه باشد و در نتیجه جداسازی فاز نیز به تاخیر می‌افتد (۵۸). میزان افزایش ویسکوزیته به عوامل بسیاری مانند نسبت پروتئین به پلی ساکارید، شرایط کونژوگه شدن و همچنین به تعاملات و اتصالات بین پروتئین‌ها و پلی ساکاریدها بستگی دارد (۵۳). با افزایش ظرفیت اتصال آب امولسیفایرهای موجود در فاز آبی خارجی امولسیون‌های دوگانه، ویسکوزیته افزایش می‌یابد (۵۹). در حالی که ویسکوزیته امولسیون‌های تثبیت شده با کونژوگه‌های ایزوله پروتئین آب پنیر - اینولین تولید شده در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد پس از مدت زمان نگهداری کاهش یافت ( $P < 0/05$ ) و در محدوده ۲/۳۱ تا ۲/۶ سانتی پواز قرار گرفت.

وزن مولکولی بالاتر با توجه به افزایش مقدار ایزوله پروتئین آب پنیر در دمای انکوباسیون ۸۰ درجه سانتی‌گراد باشد که در برابر جریان یافتن مقاومت می‌کند.

کونژوگه‌های کووالانسی، پلیمر هیبریدی با وزن مولکولی بالا هستند که به دلیل وزن مولکولی زیاد به راحتی می‌توانند سبب افزایش ویسکوزیته گردند (۵۳). نتایج (شکل ۴) مشخص ساخت که با افزایش نسبت اینولین در کونژوگه‌ها مقدار ویسکوزیته امولسیون‌ها افزایش یافت ( $P < 0/05$ ) به طوری که امولسیون‌های تثبیت شده با کونژوگه‌های ایزوله پروتئین آب پنیر - اینولین نسبت ۱:۲ بالاترین مقدار ویسکوزیته را نشان دادند. با افزایش مقدار اینولین ظرفیت اتصال به آب افزایش یافته که این امر می‌تواند منجر به افزایش ویسکوزیته ظاهری امولسیون‌ها گردد. ویسکوزیته امولسیون‌های تثبیت شده با کونژوگه‌های ایزوله پروتئین آب پنیر - اینولین تولید شده در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد پس از ۲۱



شکل ۴- ویسکوزیته ظاهری امولسیون‌های دوگانه (W/O/W) تثبیت شده با کونژوگه‌های ایزوله پروتئین آب پنیر - اینولین

Figure 4. Apparent viscosity (Pa.s) of emulsions stabilized by WPI-Inulin conjugates

نتایج مشخص ساخت با کاهش ویسکوزیته امولسیون‌های تثبیت شده با کونژوگه‌های تولیدی در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد میزان پایداری امولسیون‌ها

تغییرات ویسکوزیته طی مدت زمان نگهداری ممکن است جهت مشخص ساختن نوع بی‌ثباتی امولسیون طی این مدت استفاده گردد (۵۹) به طوری که

مدت زمان نگهداری به تدریج فاز سرمی امولسیون‌های مذکور افزایش یافت ( $P < 0/05$ ). افزایش حجم فاز سرم در طی ذخیره سازی امولسیون‌های دوگانه ممکن است به علت تجمع جزئی یا فشردگی و تراکم لایه خامه‌ای باشد (۶۵).

نتایج بررسی ویسکوزیته امولسیون‌ها نشان داد که امولسیون‌های تثبیت شده با نسبت ۲:۱ کونژوگه ایزوله پروتئین آب پنیر - اینولین ویسکوزیته کمتری نسبت به سایر امولسیون‌ها داشتند. طبق قانون استوک، امولسیون‌ها با ویسکوزیته بیشتر مقاومت بیشتری نسبت به جداسازی فازها و خامه‌ای شدن نشان می‌دهند، زیرا احتمال برخورد بین قطرات کمتر است (۶۷). هوانگ و همکاران (۲۰۲۱) نیز در مطالعه‌ای مشابه به تاثیر قابل توجه ویسکوزیته بر پایداری امولسیون‌های دوگانه اشاره کردند (۶۶).

نتایج (شکل ۵) مشخص ساخت که امولسیون‌های تثبیت شده با نسبت ۱:۲ کونژوگه ایزوله پروتئین آب پنیر - اینولین طی مدت‌زمان نگهداری پایدار بودند. پلی ساکاریدها با افزایش ویسکوزیته فاز پیوسته احتمال برخورد قطرات و در نتیجه لخته شدن و انعقاد را کاهش می‌دهند؛ علاوه بر این افزایش ویسکوزیته موجب کاهش سرعت خامه‌ای شدن می‌گردد (۴۷).

کونژوگه‌های ایزوله پروتئینی آب پنیر - اینولین می‌توانند امولسیون‌ها را از طریق افزایش دافعه فضایی و الکترواستاتیک بین قسمت‌های حجیم و آبدوست پلی ساکارید در اطراف قطرات کوچک روغن تثبیت نماید. افزایش نیروی دافعه بین قطرات امولسیون، آن‌ها را در برابر فلوکه شدن کوالسنس (ادغام) و جداسازی فاز محافظت می‌نماید (۵۳). به طور کلی، مولکول گلیکوکونژوگه حاصل در شرایط بهینه، خصوصیات امولسیفایری ایزوله پروتئینی آب پنیر، اثر تثبیت کنندگی و ویژگی‌های حلالیت اینولین را همزمان دارا می‌باشد. باقیمانده‌های آبگریز پروتئین‌های

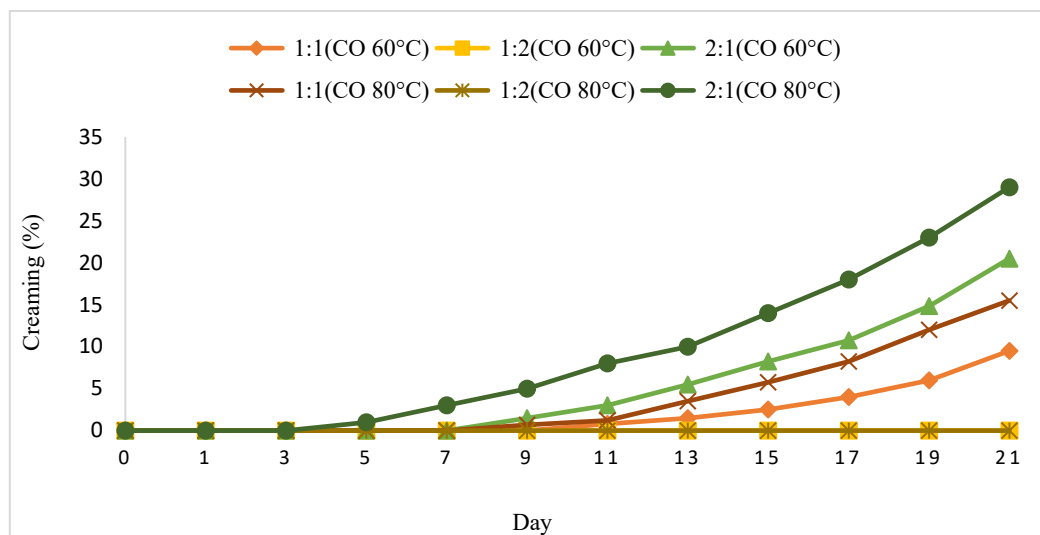
کاهش یافته است. لوتز و همکاران (۲۰۰۹) گزارش دادند که در طی دوره نگهداری امولسیون، آب از فاز آبی داخلی به فاز خارجی آزاد شده و سبب کاهش ویسکوزیته امولسیون دوگانه گردیده است (۶۰). هرگونه تغییر شکل قطرات امولسیون ممکن است ویسکوزیته و ویژگی‌های رئولوژیکی امولسیون‌های دوگانه را تحت تاثیر قابل توجه قرار دهد (۱۶).

#### خامه‌ای شدن امولسیون‌های دوگانه (W/O/W):

شاخص خامه‌ای شدن اطلاعات غیرمستقیمی در مورد میزان تجمع قطرات در یک امولسیون را مشخص می‌نماید (۶۱). پایداری امولسیون‌های دوگانه تحت تاثیر مکانیسم‌های فیزیکوشیمیایی متعددی مانند جداسازی گرانشی، لخته شدن، کوالسنس بین قطرات آبی داخلی و فاز آبی خارجی و بین گلبول‌های روغن، ادغام قطرات فاز آبی داخلی با یکدیگر و با فاز آبی خارجی و تورم یا جمع شدن قطرات آبی داخلی در نتیجه انتشار بین فازهای آبی، وارونگی فاز، رسیدن استوالد، تجمع (آگلومریزاسیون)، انعقاد و انتشار فاز میانی دستخوش تغییر می‌شود (۶۲ و ۶۳). شکل ۵ درصد ناپایداری امولسیون‌های دوگانه تثبیت شده با کونژوگه‌های ایزوله پروتئین آب پنیر - اینولین را طی ۲۱ روز نگهداری در دمای محیط نشان می‌دهد. در طی نگهداری امولسیون‌ها در دمای محیط بیشترین ناپایداری در امولسیون‌های تثبیت شده با نسبت ۲:۱ کونژوگه ایزوله پروتئین آب پنیر - اینولین تولیدی در دمای انکوباسیون ۶۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد ( $P < 0/05$ ). در نسبت‌های یکسان، امولسیون‌های تثبیت شده با کونژوگه‌های تولیدی در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد ناپایدارتر بودند. ناپایداری بالاتر امولسیون‌های اشاره شده را می‌توان به ناکافی بودن دافعه فضایی و الکترواستاتیک بین گویچه‌های فاز پراکنده در غلبه بر برهمکنش‌های جاذبه و اندروالسی و هیدروفوبیک بین آن‌ها نسبت داد (۶۴). با افزایش

باعث کاهش تعاملات قطره-قطره در سیستم امولسیون شده و در نتیجه از انسجام (کواگوله شدن) و خامه‌ای شدن قطرات جلوگیری می‌گردد (۶۸).

دنا توره شده می‌توانند به سطح قطرات روغن متصل شده درحالی‌که باقیمانده‌های آب دوست اینولین به سمت مولکول‌های آب قرار می‌گیرد. این امر در نهایت



شکل ۵- شاخص خامه‌ای شدن امولسیون‌های دوگانه (W/O/W) تثبیت شده با کونژوگه‌های ایزوله

پروتئین آب پنیر - اینولین طی ۲۱ روز نگهداری

Figure 5. Creaming profile of emulsions stabilized by WPI-Inulin conjugates during 21 days.

همچنین امولسیون‌های تثبیت شده با نسبت ۱:۲ کونژوگه ایزوله پروتئین آب پنیر - اینولین که در دمای ۶۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد تولید شده بودند، مقدار پتانسیل زتا بیشتری را در روز نخست و بعد از ۲۱ روز نگهداری نشان دادند. همچنین نتایج بررسی پایداری امولسیون‌های دوگانه (W/O/W) نیز مشخص ساخت این امولسیون‌ها پایداری بهتری نسبت به سایر امولسیون‌ها طی زمان نگهداری داشتند. به‌طور کلی مشخص شد که کونژوگه‌های ایزوله پروتئین آب پنیر - اینولین توانایی مطلوبی جهت تثبیت امولسیون‌های دوگانه به خصوص در نسبت وزنی ۱:۲ دارند، از این رو می‌توان از این امولسیون‌ها جهت ریزپوشانی ترکیبات زیست فعال مختلف استفاده نمود.

### نتیجه‌گیری کلی

بررسی اندازه قطرات امولسیون‌های دوگانه (W/O/W) نشان داد که متوسط اندازه قطرات امولسیون‌های تثبیت شده با کونژوگه‌های تولید شده در دمای ۸۰ درجه‌ی سانتی‌گراد کمتر از اندازه قطرات امولسیون‌های پایدار شده با کونژوگه‌های تولیدی در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد بود. همچنین اندازه قطرات امولسیون‌های دوگانه تثبیت شده با نسبت ۱:۲ کونژوگه ایزوله پروتئین آب پنیر - اینولین نسبت به سایر امولسیون‌ها کمتر بود. نتایج بررسی ویسکوزیته امولسیون‌ها نیز مشخص ساخت که امولسیون‌های دوگانه تثبیت شده با نسبت ۱:۲ کونژوگه ایزوله پروتئین آب پنیر - اینولین دارای ویسکوزیته بیشتری نسبت به سایر امولسیون‌ها بودند.

منابع

1. Tan, C., McClements, D.J. 2021. Application of Advanced Emulsion Technology in the Food Industry: A Review and Critical Evaluation. *Foods*. 10(4): 812.
2. Vellido-Perez, J., Ochando-Pulido, J., Brito-de la Fuente, E., Martinez-Ferez, A. 2021a. Novel emulsions-based technological approaches for the protection of omega-3 polyunsaturated fatty acids against oxidation processes-A comprehensive review. *Food Structure*. 100175.
3. Qi, P.X., Xiao, Y., Wickham, E.D. 2017. Stabilization of whey protein isolate (WPI) through interactions with sugar beet pectin (SBP) induced by controlled dry-heating. *Food Hydrocolloids*. 67: 1-13.
4. Wang, C., Wang, H., Sun, X., Sun, Y., Guo, M. 2019. Heat-Induced Interactions between Whey Protein and Inulin and Changes in Physicochemical and Antioxidative Properties of the Complexes. *International Journal of Molecular Sciences*. 20(17): 4089.
5. O'Mahony, J.A., Drapala, K.P., Mulcahy, E.M., Mulvihill, D.M. 2017. Controlled glycation of milk proteins and peptides: Functional properties. *International Dairy Journal*. 67: 16-34.
6. de Castro, R.J.S., Domingues, M.A.F., Ohara, A., Okuro, P.K., dos Santos, J.G., Brexó, R.P., Sato, H.H. 2017. Whey protein as a key component in food systems: Physicochemical properties, production technologies and applications. *Food Structure*. 14: 17-29.
7. Chen, W., Wang, W., Ma, X., Lv, R., Watharkar, R.B., Ding, T., Ye, X., Liu, D. 2019. Effect of pH-shifting treatment on structural and functional properties of whey protein isolate and its interaction with (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Food Chemistry*. 274: 234-241.
8. Sutariya, S., Patel, H. 2017. Effect of hydrogen peroxide on improving the heat stability of whey protein isolate solutions. *Food Chemistry*. 223: 114-120.
9. de Oliveira, F.C., Coimbra, J.S.d.R., de Oliveira, E.B., Zuñiga, A.D.G., Rojas, E.E.G. 2016. Food protein-polysaccharide conjugates obtained via the Maillard reaction: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 56(7): 1108-1125.
10. Sun, W.-W., Yu, S.-J., Yang, X.-Q., Wang, J.-M., Zhang, J.-B., Zhang, Y., Zheng, E.-L. 2011. Study on the rheological properties of heat-induced whey protein isolate-dextran conjugate gel. *Food Research International*. 44(10): 3259-3263.
11. Mulcahy, E.M., Fargier-Lagrange, M., Mulvihill, D.M., O'Mahony, J.A. 2017. Characterisation of heat-induced protein aggregation in whey protein isolate and the influence of aggregation on the availability of amino groups as measured by the ortho-phthaldialdehyde (OPA) and trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) methods. *Food Chemistry*. 229: 66-74.
12. Al-Hakkak, J., Al-Hakkak, F. 2010. Functional egg white-pectin conjugates prepared by controlled Maillard reaction. *Journal of Food Engineering*. 100(1): 152-159.
13. Evans, M., Ratcliffe, I., Williams, P.A. 2013. Emulsion stabilisation using polysaccharide-protein complexes. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 18(4): 272-282.
14. Wong, B.T., Day, L., Augustin, M.A. 2011. Deamidated wheat protein-dextran Maillard conjugates: Effect of size and location of polysaccharide conjugated on steric stabilization of emulsions at acidic pH. *Food Hydrocolloids*. 25(6): 1424-1432.
15. Zhang, J., Wu, N., Lan, T., Yang, X. 2014. Improvement in emulsifying properties of soy protein isolate by conjugation with maltodextrin using high-temperature, short-time dry-heating Maillard reaction. *International Journal of Food Science & Technology*. 49(2): 460-467.
16. Tamnak, S., Mirhosseini, H., Tan, C.P., Ghazali, H.M., Muhammad, K. 2016. Physicochemical properties, rheological behavior and morphology of pectin-pea protein isolate mixtures and conjugates in aqueous system and oil in water emulsion. *Food Hydrocolloids*. 56: 405-416.
17. Wang, L.-H., Sun, X., Huang, G.-Q., Xiao, J.-X. 2018. Conjugation of soybean protein isolate with xylose/fructose through wet-heating Maillard reaction. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 12(4): 2718-2724.
18. Zha, F., Dong, S., Rao, J., Chen, B. 2019. The structural modification of pea protein concentrate with gum Arabic by controlled Maillard reaction enhances its functional properties

- and flavor attributes. *Food Hydrocolloids*. 92: 30-40.
19. Song, Y., Yang, S., Li, J. 2020. Effect of Maillard reaction conditions on the solubility and molecular properties of wheat gluten–maltose conjugates. *Food science & nutrition*. 8: 5898-5906.
  20. Giarnetti, M., Paradiso, V.M., Caponio, F., Summo, C., Pasqualone, A. 2015. Fat replacement in shortbread cookies using an emulsion filled gel based on inulin and extra virgin olive oil. *LWT - Food Science and Technology*. 63(1): 339-345.
  21. Leyva-Porras, C., López-Pablos, A., Alvarez-Salas, C., Perez-Urizar, J., Saavedra-Leos, Z. 2015. Physical properties of inulin and technological applications. *Polysaccharides*; Ramawat, KG, Mérillon, JM, Eds.; Springer: New York, NY, USA. 959-984.
  22. Schmidt, U.S., Pietsch, V.L., Rentschler, C., Kurz, T., Endreß, H.U., Schuchmann, H.P. 2016. Influence of the degree of esterification on the emulsifying performance of conjugates formed between whey protein isolate and citrus pectin. *Food Hydrocolloids*. 56: 1-8.
  23. Mohammadi, A., Jafari, S.M., Assadpour, E., Faridi Esfanjani, A. 2016. Nano-encapsulation of olive leaf phenolic compounds through WPC–pectin complexes and evaluating their release rate. *International Journal of Biological Macromolecules*. 82: 816-822.
  24. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680.
  25. Pirestani, S., Nasirpour, A., Keramat, J., Desobry, S., Jasniewski, J. 2018. Structural properties of canola protein isolate-gum Arabic Maillard conjugate in an aqueous model system. *Food Hydrocolloids*. 79: 228-234.
  26. Martins, J.T., Cerqueira, M.A., Bourbon, A.I., Pinheiro, A.C., Souza, B.W., Vicente, A.A. 2012. Synergistic effects between  $\kappa$ -carrageenan and locust bean gum on physicochemical properties of edible films made thereof. *Food Hydrocolloids*. 29(2): 280-289.
  27. Yang, Y., Cui, S., Gong, J., Miller, S.S., Wang, Q., Hua, Y. 2015. Stability of citral in oil-in-water emulsions protected by a soy protein–polysaccharide Maillard reaction product. *Food Research International*. 69: 357-363.
  28. Gómez-Ordóñez, E., Rupérez, P. 2011. FTIR-ATR spectroscopy as a tool for polysaccharide identification in edible brown and red seaweeds. *Food Hydrocolloids*. 25(6): 1514-1520.
  29. Zhu, X., Jia, C., Meng, X., Xing, M., Yi, Y., Gao, X. 2018. Synthesis, characterization of inulin propionate ester, and evaluation of its in vitro effect on SCFA production. *Starch-Stärke*. 70(9-10): 1800037.
  30. Barth, A. 2007. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 1767(9): 1073-1101.
  31. Sadeghi, S., Madadlou, A., Yarmand, M. 2014. Microemulsification–cold gelation of whey proteins for nanoencapsulation of date palm pit extract. *Food Hydrocolloids*. 35: 590-596.
  32. Ozel, B., Aydin, O., Oztop, M.H. 2020. In vitro digestion of polysaccharide including whey protein isolate hydrogels. *Carbohydrate Polymers*. 229: 115469.
  33. Lefèvre, T., Subirade, M. 1999. Structural and interaction properties of  $\beta$ -Lactoglobulin as studied by FTIR spectroscopy. *International Journal of Food Science & Technology*. 34(5-6): 419-428.
  34. Ye, M., Zhou, R., Shi, Y., Chen, H., Du, Y. 2017. Effects of heating on the secondary structure of proteins in milk powders using mid-infrared spectroscopy. *Journal of Dairy Science*. 100(1): 89-95.
  35. González-Martínez, D., Carrillo-Navas, H., Barrera-Díaz, C., Martínez-Vargas, S., Alvarez-Ramírez, J., Pérez-Alonso, C. 2017. Characterization of a novel complex coacervate based on whey protein isolate-tamarind seed mucilage. *Food Hydrocolloids*. 72: 115-126.
  36. Shi, Y., Liang, R., Chen, L., Liu, H., Goff, H.D., Ma, J., Zhong, F. 2019. The antioxidant mechanism of Maillard reaction products in oil-in-water emulsion system. *Food Hydrocolloids*. 87: 582-592.
  37. Nooshkam, M., Madadlou, A. 2016. Microwave-assisted isomerisation of lactose to lactulose and Maillard conjugation of lactulose and lactose with whey proteins and peptides. *Food Chemistry*. 200: 1-9.

38. Dong, X., Du, S., Deng, Q., Tang, H., Yang, C., Wei, F., Chen, H., Quek, S.Y., Zhou, A., Liu, L. 2020. Study on the antioxidant activity and emulsifying properties of flaxseed gum-whey protein isolate conjugates prepared by Maillard reaction. *International Journal of Biological Macromolecules*. 153: 1157-1164.
39. Apolinário, A.C., de Carvalho, E.M., de Lima Damasceno, B.P.G., da Silva, P.C.D., Converti, A., Pessoa Jr, A., da Silva, J.A. 2017. Extraction, isolation and characterization of inulin from *Agave sisalana* boles. *Industrial Crops and Products*. 108: 355-362.
40. Carpenter, J.F., Crowe, J.H. 1989. An infrared spectroscopic study of the interactions of carbohydrates with dried proteins. *Biochemistry*. 28(9): 3916-3922.
41. Tan, S., Zhong, C., Langrish, T. 2020. Pre-gelation assisted spray drying of whey protein isolates (WPI) for microencapsulation and controlled release. *LWT*. 117: 108625.
42. Nasrollahzadeh, F., Varidi, M., Koocheki, A., Hadizadeh, F. 2017. Effect of microwave and conventional heating on structural, functional and antioxidant properties of bovine serum albumin-maltodextrin conjugates through Maillard reaction. *Food Research International*. 100: 289-297.
43. Barbosa, J.M., Ushikubo, F.Y., de Figueiredo Furtado, G., Cunha, R.L. 2019. Oil in water emulsions stabilized by maillard conjugates of sodium caseinate-locust bean gum. *Journal of Dispersion Science and Technology*. 40(5): 634-645.
44. Einhorn-Stoll, U., Kastner, H., Drusch, S. 2014. Thermally induced degradation of citrus pectins during storage—Alterations in molecular structure, colour and thermal analysis. *Food Hydrocolloids*. 35: 565-575.
45. Perrechil, F., Santana, R., Lima, D., Polastro, M., Cunha, R. 2014. Emulsifying properties of maillard conjugates produced from sodium caseinate and locust bean gum. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 31(2): 429-438.
46. Liu, G., Zhong, Q. 2015. High temperature-short time glycation to improve heat stability of whey protein and reduce color formation. *Food Hydrocolloids*. 44: 453-460.
47. McClements, D.J., (2004). *Food emulsions: principles, practices, and techniques*. CRC press.
48. Zhou, Y., Teng, F., Tian, T., Sami, R., Wu, C., Zhu, Y., Zheng, L., Jiang, L., Wang, Z., Li, Y. 2020. The impact of soy protein isolate-dextran conjugation on capsicum oleoresin (*Capsicum annuum* L.) nanoemulsions. *Food Hydrocolloids*. 108: 105818.
49. Weiss, J., Muschiolik, G. 2007. Factors affecting the droplet size of water-in-oil emulsions (W/O) and the oil globule size in water-in-oil-in-water emulsions (W/O/W). *Journal of Dispersion Science and Technology*. 28(5): 703-716.
50. Mutaliyeva, B., Grigoriev, D., Madybekova, G., Sharipova, A., Aidarova, S., Saparbekova, A., Miller, R. 2017. Microencapsulation of insulin and its release using w/o/w double emulsion method. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 521: 147-152.
51. Pagano, A.P.E., Khalid, N., Kobayashi, I., Nakajima, M., Neves, M.A., Bastos, E.L. 2018. Microencapsulation of betanin in monodisperse W/O/W emulsions. *Food Research International*. 109: 489-496.
52. Wilde, P.J. 2019. *Improving Emulsion Stability Through Selection of Emulsifiers and Stabilizers*. Reference Module in Food Science.
53. Amid, B.T., Mirhosseini, H. 2014. Stabilization of water in oil in water (W/O/W) emulsion using whey protein isolate-conjugated durian seed gum: Enhancement of interfacial activity through conjugation process. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 113: 107-114.
54. Delfanian, M., Razavi, S.M.A., Haddad Khodaparast, M.H., Esmailzadeh Kenari, R., Golmohammadzadeh, S. 2018. Influence of main emulsion components on the physicochemical and functional properties of W/O/W nano-emulsion: Effect of polyphenols, Hi-Cap, basil seed gum, soy and whey protein isolates. *Food Research International*. 108: 136-143.
55. Flores-Andrade, E., Allende-Baltazar, Z., Sandoval-González, P.E., Jiménez-Fernández, M., Beristain, C.I., Pascual-Pineda, L.A. 2021. Carotenoid nanoemulsions stabilized by natural emulsifiers: Whey protein, gum Arabic, and soy lecithin. *Journal of Food Engineering*. 290: 110208.

56. Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S., Mozafari, M. 2018. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics*. 10(2): 57.
57. Bonnet, M., Cansell, M., Berkaoui, A., Ropers, M.-H., Anton, M., Leal-Calderon, F. 2009. Release rate profiles of magnesium from multiple W/O/W emulsions. *Food Hydrocolloids*. 23(1): 92-101.
58. Leiva-Vega, J., Villalobos-Carvajal, R., Ferrari, G., Donsì, F., Zúñiga, R.N., Shene, C., Beldarraín-Iznaga, T. 2020. Influence of interfacial structure on physical stability and antioxidant activity of curcumin multilayer emulsions. *Food and Bioproducts Processing*. 121: 65-75.
59. O'Regan, J., Mulvihill, D.M. 2010. Sodium caseinate–maltodextrin conjugate stabilized double emulsions: Encapsulation and stability. *Food Research International*. 43(1): 224-231.
60. Lutz, R., Aserin, A., Wicker, L., Garti, N. 2009a. Double emulsions stabilized by a charged complex of modified pectin and whey protein isolate. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 72(1): 121-127.
61. Sun, C., Gunasekaran, S., Richards, M.P. 2007. Effect of xanthan gum on physicochemical properties of whey protein isolate stabilized oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*. 21(4): 555-564.
62. Yildirim, M., Sumnu, G., Sahin, S. 2017. The effects of emulsifier type, phase ratio, and homogenization methods on stability of the double emulsion. *Journal of Dispersion Science and Technology*. 38(6): 807-814.
63. Herzi, S., Essafi, W., Bellagha, S., Leal-Calderon, F. 2014. Influence of the inner droplet fraction on the release rate profiles from multiple W/O/W emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 441: 489-495.
64. Liu, J., Liu, W., Salt, L.J., Ridout, M.J., Ding, Y., Wilde, P.J. 2018b. Fish oil emulsions stabilized with caseinate glycosylated by dextran: Physicochemical stability and gastrointestinal fate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 67(1): 452-462.
65. Giroux, H.J., Constantineau, S., Fustier, P., Champagne, C.P., St-Gelais, D., Lacroix, M., Britten, M. 2013. Cheese fortification using water-in-oil-in-water double emulsions as carrier for water soluble nutrients. *International Dairy Journal*. 29(2): 107-114.
66. Huang, H., Wang, D., Belwal, T., Dong, L., Lu, L., Zou, Y., Li, L., Xu, Y., Luo, Z. 2021. A novel W/O/W double emulsion co-delivering brassinolide and cinnamon essential oil delayed the senescence of broccoli via regulating chlorophyll degradation and energy metabolism. *Food Chemistry*. 356: 129704.
67. Castel, V., Rubiolo, A.C., Carrara, C.R. 2017. Droplet size distribution, rheological behavior and stability of corn oil emulsions stabilized by a novel hydrocolloid (Brea gum) compared with gum arabic. *Food Hydrocolloids*. 63: 170-177.
68. Li, K., Woo, M.W., Patel, H., Selomulya, C. 2017. Enhancing the stability of protein-polysaccharides emulsions via Maillard reaction for better oil encapsulation in spray-dried powders by pH adjustment. *Food Hydrocolloids*. 69: 121-131.