

Comparison of the effects of inulin and maltodextrin on the Pickering emulsions properties stabilized using whey protein microgels via the Maillard reaction

Seyed Hossein Izadi ¹, Gholamreza Askari^{2✉}, Zahra EmamDjomeh³, Maryam Salami⁴ and Fatemeh Ghodrati⁵

¹Ph.D. Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agricultural Engineering, University of Tehran, Karaj, Iran

^{2,4}Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agricultural Engineering, University of Tehran, Karaj, Iran

³Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agricultural Engineering, University of Tehran, Karaj, Iran

⁵B.sc. graduate, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agricultural Engineering, University of Tehran, Karaj, Iran

✉ Corresponding author: iraskari@ut.ac.ir,

ARTICLE INFO

Article type:

Research Article

Article history:

Received: 2024-10-13

Revised: 2024-11-24

Accepted: 2024-12-24

Keywords:

Pickering emulsion, Inulin, Maltodextrin, Whey protein microgel, Maillard reaction

ABSTRACT

Background: Pickering emulsions, one of the most innovative emulsion systems, have recently attracted considerable attention. The main advantage of these systems is their high stability against coalescence.

Aims: To evaluate the effect of saccharide type and the Maillard reaction on the stability of high internal phase Pickering emulsions as well as their structural and physicochemical properties.

Methods: Particle size, surface tension, emulsifying properties, hydrodynamic diameter, and surface electrical charge (zeta potential) of whey protein microgel–maltodextrin conjugates were measured.

Results: The emulsion stabilized with the microgel–inulin nanoconjugate formed a dense network with the smallest oil droplet size (8.9 μm) and the lowest creaming index (34%). This emulsion also exhibited the highest viscosity, emulsifying activity, and physical stability. These findings are attributed to the increased degree of conjugation and zeta potential, as well as the reduced surface tension of saccharide-modified microgel nanoparticles. FTIR spectroscopy was used to investigate the functional groups in the product. Considering the low amounts of protein and saccharide used, and despite the fact that neither inulin nor maltodextrin are gel-forming agents capable of creating a network, the Maillard reaction in the conjugated compounds played an effective role in the formation of high internal phase Pickering emulsions.

Conclusion: The conjugation of whey protein microgel nanoparticles with inulin and maltodextrin can be considered an effective strategy for producing stable Pickering emulsions with desirable physicochemical properties for applications in the food, pharmaceutical, and cosmetic industries.



Extended Abstract

Introduction: Pickering emulsions, an innovative emulsion system, have recently attracted significant attention. These emulsions achieve stability through the use of solid particles rather than synthetic surfactants, offering high resistance to coalescence. Unlike surfactants, these particles are insoluble in water and oil, and they stabilize the emulsion by forming a physical barrier at the oil-water interface, which prevents droplet merging. Such features make Pickering emulsions a sustainable, environmentally friendly, and safe choice for applications in the food, pharmaceutical, and cosmetic industries. With the rising demand among consumers for natural and safer products, there is increasing interest in developing biocompatible, particle-stabilized Pickering emulsions. In recent years, biopolymers—often referred to as “green” alternatives—have been explored to replace synthetic emulsifiers in food products. Biopolymers, including proteins and carbohydrates, offer nutritional value, natural origins, and biocompatibility, making them appealing as replacements for industrial emulsifiers. Proteins are useful for emulsification due to their amphiphilic nature but can be unstable under external processing conditions such as temperature, pH, and salts. Carbohydrates, on the other hand, enhance emulsion stability by increasing viscosity but are not surface-active enough to function as emulsifiers on their own. However, combining and modifying proteins and saccharides can enhance their emulsifying properties. Key modifications include forming protein microgel structures or conjugating proteins with carbohydrates via the Maillard reaction, which improves their functional stability, thermal resistance, and solubility. Whey protein, a cheese industry byproduct rich in essential amino acids, is known for its rapid absorption and high bioavailability. Due to its favorable functional properties, including three-dimensional network formation, strong particle bonding, and biocompatibility, whey protein microgels are considered a promising stabilizer for Pickering emulsions. Conjugating whey protein microgels with saccharides such as inulin and maltodextrin via the Maillard reaction can further enhance their emulsifying capabilities, affecting properties like surface tension, and improving stability against temperature and pH fluctuations. Inulin and maltodextrin are commonly used saccharides in food science. Maltodextrin, a tasteless, water-soluble oligosaccharide, is widely used due to its

low cost and ease of production from corn starch. In contrast, inulin, a fructan polysaccharide with prebiotic benefits, is non-digestible and reaches the large intestine intact. It is valued for its ability to reduce calorie intake, lower blood lipids, and increase satiety, making it popular in low-calorie foods as a thickening and stabilizing agent. This study aims to investigate the effectiveness of whey protein microgel conjugates with inulin and maltodextrin in stabilizing Pickering emulsions. The primary focus is to assess the influence of saccharide type and the Maillard reaction on emulsion stability, structure, and physicochemical properties in systems with a high internal phase. The findings contribute to understanding polysaccharide roles in protein conjugates, supporting the development of more stable and safer Pickering emulsions for various industries.

Materials and Methods: Whey protein isolate was dissolved in Milli-Q water to a concentration of 40 mg/mL. The protein dispersion was stirred at 25 °C for 2 hours, then incubated at 4 °C for 12 hours to ensure full hydration. The pH was adjusted to 5.80 ± 0.05 using 1.0 M HCl with a pH-meter. Next, the dispersion was heated in a water bath at 85 °C for 15 minutes, without stirring, to form whey protein microgels (WPMs), and rapidly cooled to 4 °C in an ice-water bath. Freshly prepared WPM was then combined with inulin (In) and maltodextrin (Md) at a 2:2 protein-to-saccharide ratio, and these were labeled as In:WPM and Md:WPM, respectively. Additionally, a mixture containing both saccharides in a 2:1:1 protein:inulin:maltodextrin ratio was prepared and labeled In:Md:WPM. All mixtures were prepared at a total concentration of 4% w/w. The pH was adjusted to 8.0 using NaOH. The dispersions were then heated in a 90 °C water bath for 1 hour, followed by rapid cooling in an ice-water bath. Samples were dialyzed against Milli-Q water (pH-matched) using a 14,000 Da molecular weight cutoff membrane, and stored at 4 °C for further analysis. WPM heated without carbohydrate was labeled WPM. To ensure repeatability, three separate samples were prepared per run, with each experiment conducted in triplicate. After the Maillard reaction, degree of grafting (DG), particle size, zeta potential, and surface tension of the nanoparticles were measured. For HIPPE preparation, soybean oil ($\phi_{oil} = 0.80$) was added to both conjugated and unconjugated WPM dispersions (pH = 7.0). Emulsification was achieved via homogenization at 24,000 rpm for 4 minutes using an Ultra-Turrax

disperser, and the emulsions were analyzed on the same day. FTIR spectroscopy, droplet size, polydispersity index (PDI), emulsification activity index (EAI), emulsification stability index (ESI), creaming index, and viscosity of HIPPEs were also determined.

Results and discussion: Regarding modification/conjugation degree, the Maillard reaction enabled covalent bonding between whey protein microgel and saccharides, with inulin (polysaccharide) showing a higher degree of conjugation than maltodextrin (oligosaccharide) due to its longer chain length and greater availability of carbonyl groups. Without carbohydrates, modification in WPM was minimal, likely from trace lactose interactions. The particle size increased with saccharide addition, with inulin contributing more significantly due to its larger chain, which expanded the WPM particles' volume. This larger size supports stability in high internal-phase Pickering emulsions. After the Maillard reaction, increased zeta potential improved electrostatic repulsion and stability, as all samples carried a negative charge at pH 7 (above WPM's isoelectric point). All conjugated WPM particles reduced surface tension, a critical factor for emulsion stability. Inulin showed a greater reduction in surface tension than maltodextrin due to its long, unbranched chain, which better covers the particle surfaces. In terms of HIPPEs, FTIR analysis indicated characteristic protein-related amide bands and triglyceride peaks from the oil phase, with changes in amide peaks supporting protein modification during glycation. Moreover, saccharide addition led to smaller oil droplets, which are more stable, as larger WPM particles occupied more space, restricting oil mobility and droplet size. WPM conjugated with carbohydrates, especially inulin, showed higher emulsion activity index than unconjugated WPM. Inulin's large and linear structure enabled better surface protection around oil droplets, enhancing stability. Similarly, conjugated WPM-stabilized emulsions had greater

stability than unconjugated ones. Inulin's structure formed a stronger protective layer compared to maltodextrin, reducing droplet agglomeration and enhancing stability. Also, conjugation with saccharides, particularly inulin, increased viscosity and emulsion uniformity. Higher viscosity supports stability by increasing the interfacial area and promoting shear-thinning behavior. Finally, the creaming index decreased with carbohydrate addition, particularly with a higher inulin-to-maltodextrin ratio, due to increased oil droplet density and viscosity, reflecting the positive impact of the Maillard reaction on stability and creaminess.

Conclusion: The findings of this study indicate that conjugating whey protein microgels (WPM) with inulin and maltodextrin via the Maillard reaction is an effective method for producing stable Pickering emulsions with a high internal phase. Among the compounds tested, WPM conjugates with inulin exhibited a greater impact on improving emulsion properties and stability. This enhanced functionality is likely due to inulin's longer molecular chains, which provide stronger steric repulsion, lower surface tension, and form more stable interfacial layers compared to maltodextrin. Overall, this research highlights the substantial potential of the Maillard reaction for enhancing emulsion performance and boosting the emulsifying capacity of natural proteins by conjugating them with saccharides. Conjugated whey protein nanoparticles with inulin and maltodextrin show promise as an effective approach for creating stable Pickering emulsions with favorable physicochemical characteristics for applications in the food, pharmaceutical, and cosmetic industries. Additionally, these Pickering emulsions can serve as precursors or integral components in innovative products, such as oleogels, paving the way for further advancements in these fields.

مقایسه تأثیر اینولین و مالتودکسترین بر ویژگی‌های امولسیون‌های پیکرینگ پایدار شده با میکروژل پروتئین آب‌پنیر از طریق واکنش میلارد

سید حسین ایزدی^۱، غلامرضا عسکری^۲ ✉، زهرا امام جمعه^۳، مریم سلامی^۴ و فاطمه قدرتی^۵

^۱ دانشجوی دکتری، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی، دانشگاه تهران

^۲ دانشیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی، دانشگاه تهران

^۳ استاد گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی، دانشگاه تهران

^۴ دانش‌آموخته کارشناسی گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی، دانشگاه تهران

✉ مسئول مکاتبه: iraskari@ut.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: امولسیون پیکرینگ، یکی از نوآورانه‌ترین سیستم‌های امولسیون، اخیراً توجه زیادی را به خود جلب کرده است. مزیت این محصول پایداری بالا در برابر پدیده ادغام است. **هدف:** ارزیابی تأثیر نوع ساکارید و همچنین واکنش میلارد بر پایداری امولسیون پیکرینگ با فاز پراکنده بالا و ساختار و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آن است. **روش کار:** اندازه‌گیری اندازه ذرات، کشش سطحی، ویژگی‌های امولسیون‌کنندگی، قطر هیدرودینامیکی، بارالکتریکی سطحی مزدوج میکروژل آب‌پنیر و مالتودکسترین **نتایج:** امولسیون پایدار شده با نانومزدوج میکروژل- اینولین یک شبکه متراکم با کوچکترین اندازه قطرات روغن ($8/9 \mu\text{m}$) و کمترین اندیس خامه‌ای شدن (۳۴٪) را به وجود آورد. همچنین، این امولسیون بیشترین میزان ویسکوزیته، فعالیت امولسیون‌شوندگی، و پایداری فیزیکی را نشان داد. این دست‌آورد مربوط به افزایش درجه مزدوج‌شدن و پتانسیل زتا، و همینطور کاهش کشش سطحی نانوذرات میکروژل اصلاح‌شده با ساکارید است. طیف‌سنجی FTIR به منظور بررسی گروه‌های عملگرایی اجزای مختلف امولسیون‌های پیکرینگ با فاز داخلی بالا انجام شد. با توجه به مقادیر پایین پروتئین و ساکارید استفاده‌شده و علی‌رغم این‌که اینولین و مالتودکسترین هیچ‌کدام ژل‌ساز نیستند و توانایی ایجاد شبکه ندارند، واکنش میلارد در ترکیبات مزدوج‌شده توانست نقش موثری در تولید امولسیون پیکرینگ با فاز پراکنده بالا ایفا کند. **نتیجه‌گیری کلی:** مزدوج‌سازی نانوذرات پروتئین آب‌پنیر با اینولین و مالتودکسترین می‌تواند به عنوان یک رویکرد مؤثر برای تولید امولسیون‌های پیکرینگ پایدار و دارای ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی مطلوب در صنایع غذایی، دارویی، و آرایشی مورد استفاده قرار گیرد.

مشخصات مقاله

نوع مقاله:

علمی پژوهشی

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۱۴۰۳/۸/۲۳

بازنگری: ۱۴۰۳/۹/۴

پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۴

کلید واژه:

امولسیون پیکرینگ، اینولین، مالتودکسترین، میکروژل پروتئین آب‌پنیر، واکنش میلارد

مقدمه

ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی این بیوپلیمرها شود (چئون و همکاران ۲۰۲۳). از جمله این اصلاحات می‌توان به ایجاد ساختار ذره‌ای پروتئین از طریق ساخت میکروژل، و یا ایجاد پیوند کووالانسی و اتصالات کنژوگه بین پروتئین و کربوهیدرات طی واکنش میلارد اشاره کرد که موجب بهبود ویژگی‌های عملکردی پروتئین و ساکارید، افزایش مقاومت حرارتی و حلالیت این محصولات می‌گردد (کرباسی و عسگری ۲۰۲۱).

پروتئین آب‌پنیر یکی از محصولات جانبی صنعت پنیرسازی است که حاوی طیف گسترده‌ای از اسیدهای آمینه ضروری که به سرعت جذب می‌شوند، می‌باشد. میکروژل‌های پروتئین آب‌پنیر به دلیل خصوصیات عملکردی مطلوب از جمله قابلیت تشکیل شبکه‌های سه‌بعدی، توانایی ایجاد پیوندهای قوی با ذرات دیگر و زیست‌سازگاری بالا، به عنوان گزینه‌ای مناسب برای پایدارسازی امولسیون‌های پیکرینگ مطرح شده‌اند. به علاوه، بهبود خواص عملکردی این میکروژل‌ها از طریق کنژوگه شدن با ساکاریدهایی مانند اینولین و مالتودکسترین، می‌تواند قابلیت‌های آن‌ها را برای پایدارسازی امولسیون‌ها افزایش دهد. کنژوگه کردن میکروژل پروتئین آب‌پنیر با ساکاریدها از طریق واکنش میلارد نه تنها می‌تواند ساختار سه‌بعدی و ثبات امولسیون‌ها را بهبود بخشد، بلکه می‌تواند بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی مانند کشش سطحی و پایداری در برابر دما و pH نیز تاثیرگذار باشد.

اینولین و مالتودکسترین دو کربوهیدرات پرکاربرد در علوم غذایی هستند. مالتودکسترین اولیگوساکاریدی فاقد طعم شیرین (برخلاف شربت گلوکز) و محلول در آب سرد (برخلاف نشاسته) است (دوکیک و همکاران ۱۹۹۸)، که به صورت پودر سفیدرنگ یا شربت غلیظ در دسترس می‌باشد. مالتودکسترین نسبت به اکثر هیدروکلوئیدهای خوراکی ارزان‌تر بوده و ماده خام اصلی که به صورت گسترده‌ای در تولید آن مورد استفاده قرار می‌گیرد، نشاسته ذرت است (کرونایس، ۱۹۹۸). اینولین، یک پلی‌ساکارید خطی از واحدهای فروکتوز (فروکتان) است که می‌تواند با درجه‌های متغیر پلیمریزه شدن باشد. اینولین به دلیل نبود آنزیم برای انسان قابلیت هضم پذیری ندارد، بنابراین

امولسیون پیکرینگ، به عنوان یکی از نوآورانه‌ترین سیستم‌های امولسیون، اخیراً توجه زیادی را به خود جلب کرده است. در این نوع امولسیون‌ها، پایداری از طریق ذرات جامد و بدون نیاز به استفاده از سورفکتانت‌های مصنوعی ایجاد می‌شود. مهمترین مزیت این روش پایداری بالای امولسیون در برابر پدیده ادغام است. این ذرات در آب و روغن محلول نیستند و در لایه بین سطحی قرار می‌گیرند. در نتیجه ذرات قادر هستند که امولسیون را از طریق مانع فیزیکی در برابر پدیده ادغام پایدار کنند (ناجی طبس و همکاران ۲۰۲۰). این ویژگی‌ها امولسیون‌های پیکرینگ را به گزینه‌ای پایدار، دوست‌دار محیط زیست و ایمن در صنایع غذایی، دارویی و آرایشی تبدیل کرده است. از آنجایی که امروزه مصرف‌کنندگان به دنبال محصولات طبیعی و ایمن‌تر هستند، توسعه و بهینه‌سازی امولسیون‌های پیکرینگ که با ذرات زیست‌سازگار پایدار شده‌اند، اهمیت بیشتری یافته است.

در سال‌های اخیر توجه ویژه‌ای به استفاده از پلیمرهای زیستی یا اصطلاحاً محصولات سبز به منظور جایگزینی امولسیفایرهای غیرآلی و سنتزی در امولسیون‌های غذایی شده‌است (بورگر و ژانگ ۲۰۱۹). ارزش تغذیه‌ای، ماهیت طبیعی، و زیست‌سازگاری از جمله مزیت‌های این محصولات نسبت به امولسیفایرهای صنعتی است که آن‌ها را به عنوان جایگزین‌های مناسب برای تولید و پایدارسازی امولسیون‌ها جذاب می‌کند (وو و همکاران ۲۰۱۵). پروتئین‌ها از جمله موادی هستند که به دلیل وجود هر دو جزء آبدوست و آبگریز دارای خاصیت امولسیفایرکنندگی هستند ولی پروتئین به راحتی توسط عوامل بی‌ثبات‌کننده خارجی، مانند دما، یون‌های نمک و pH در طول فرآوری مواد غذایی مختل می‌شود (چئون و همکاران ۲۰۲۳). همچنین کربوهیدرات‌ها به دلیل قابلیت ویسکوزکنندگی فاز پیوسته در افزایش پایداری امولسیون‌ها نقش دارند ولی به دلیل فعالیت سطحی کم و آب دوستی بالا قادر نیستند به صورت منفرد به عنوان امولسیفایر در سیستم‌های غذایی استفاده شوند (شبیر و همکاران ۲۰۲۳). هرچند اصلاح پروتئین‌ها و استفاده توأم پروتئین و ساکارید می‌تواند موجب بهبود

تهیه میکروژل آب‌پنیر

ایزوله پروتئین آب‌پنیر در آب مقطر در غلظت ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (۴۰ mg/mL)، حل شد. ۰/۰۲٪ سدیم آزاید جهت جلوگیری از فعالیت احتمالی میکروبی در طول نگهداری به محلول اضافه شد. همزنی دیسپرسیون پروتئینی حاصل، در دمای اتاق به مدت ۲ ساعت ادامه داشت، و نهایتاً در دمای یخچال به مدت ۱۲ ساعت، برای اطمینان از آگیری کامل پروتئین استراحت کرد. سپس pH نمونه، روی عدد ۵/۸۰±۰/۰۵، با استفاده از اسید کلریدریک یک مولار، و پی-اچ متر متروم ۷۴۴ (هریسائو، سوییس) تنظیم شد. پس از آن، دیسپرسیون بدون همزنی، در حمام آب داغ در دمای ۸۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه حرارت داده شد، تا میکروژل پروتئین آب‌پنیر تشکیل شود. با اتمام زمان حرارت دهی، نمونه‌ها به سرعت به حمام آب و یخ منتقل و تا دمای ۴ درجه سلسیوس خنک شدند (کرباسی و عسکری ۲۰۲۱).

تشکیل ساختار نانومزدوج‌های واکنش میلارد

میکروژل پروتئین آب‌پنیری^۱ (WPM) که تازه تهیه شده بود، با نسبت ۲:۲ پروتئین:ساکارید، با اینولین^۲ (In) و مالتودکسترین^۳ (Md) مخلوط شده و به ترتیب به صورت In:WPM و Md:WPM نامگذاری شدند. همچنین نمونه متشکل از پروتئین با هر دو پلی ساکارید با نسبت ۱:۱:۲ پروتئین:اینولین:مالتودکسترین تهیه شده و به صورت In:Md:WPM نامگذاری شد. تمامی این مخلوط‌ها با غلظت کلی ۴ درصد وزن/وزنی (۴٪ w/w) تهیه شدند. pH دیسپرسیون، روی ۸ با استفاده از محلول سود (NaOH) تنظیم شد. سپس دیسپرسیون‌ها در حمام آب در ۹۰ درجه سلسیوس، به مدت یک ساعت حرارت داده شدند (کرباسی و همکاران ۲۰۱۹). طبق مطالعات قبلی کرباسی و همکاران در سال ۲۰۱۹، این زمان و دمای حرارت‌دهی منجر به درجه گلابکه شدن بهینه، کاهش تشکیل محصولات پیشرفته واکنش میلارد^۴ (AMREs) و همچنین بهبود ویژگی‌های عملگرایی محصولات می‌گردد. پس

به صورت دست نخورده مسیر گوارش را تا رسیدن به روده بزرگ طی کرده و به عنوان یک پری‌بیوتیک عمل می‌کند. این کربوهیدرات باعث کاهش کالری مواد غذایی و چربی خون می‌شود، در حالی که احساس سیری را افزایش می‌دهد (لی و همکاران، ۲۰۲۲). این ساکارید به طور گسترده‌ای به عنوان عامل قوام دهنده و پایدار کننده به خصوص در مواد غذایی با کالری پایین استفاده می‌شود (دسوزا پاگلارینی و همکاران ۲۰۲۱؛ لی و همکاران ۲۰۲۲).

این پژوهش به بررسی و مقایسه اثربخشی کنژوگه‌های میکروژل پروتئین آب‌پنیر با اینولین و مالتودکسترین در ساخت امولسیون‌های پیکرینگ می‌پردازد. هدف اصلی این تحقیق، ارزیابی تأثیر نوع ساکارید و همچنین واکنش میلارد بر پایداری امولسیون پیکرینگ با فاز پراکنده بالا و ساختار و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آن است. نتایج این پژوهش می‌تواند به درک بهتر نقش پلی ساکاریدها در کنژوگه‌های پروتئینی و توسعه امولسیون‌های پیکرینگ پایدارتر و ایمن‌تر در صنایع مختلف کمک کند.

مواد و روش‌ها

مواد

ایزوله پروتئین آب‌پنیر، توسط شرکت بین المللی مواد غذایی داویوسکو فود اینترنشنال (ایالات متحده آمریکا) اهدا شد. اینولین با درجه پلیمریزاسیون بالا ($DP \leq 23$) از شرکت روسندال (هلند) تهیه شد. مالتودکسترین با وزن مولکولی ۱۰۰۰ دالتون و درجه پلیمریزاسیون حدود ۵، از شرکت اینگردیون GmbH (کشور آلمان) تامین شد. روغن سویا از یک سوپرمارکت محلی خریداری شد. همه مواد شیمیایی دیگر و معرف‌هایی که در این مطالعه استفاده شدند، از درجه‌ی آنالیتیکال و آزمایشگاهی بوده و از شرکت مرک (دارمستات، آلمان) تهیه شده‌اند.

³-Maltodextrin

⁴- Advanced Maillard Reaction End-Products

¹-Whey Protein Microgel

²-Inulin

استفاده از روش حلقه "دو نوئی" (Du Noüy Ring) در pH برابر با ۷ و دمای ۲۵ درجه سلسیوس اندازه‌گیری شد. آماده‌سازی امولسیون‌های پیکرینگ با فاز داخلی بالا^۱ (HIPPE) برای تهیه امولسیون پیکرینگ با فاز داخلی بالا (HIPPE)، روغن سویا بدون هرگونه امولسیفایری (در غلظت ۸۰ درصد، $\phi_{oil}=0.80$) به دیسپرسیون‌های میکروژل پروتئین آب‌پنیر مزدوج‌شده و مزدوج‌نشده (pH=۷) اضافه شد. امولسیون سازی از طریق هم‌وزن کردن در ۲۴۰۰۰ دور بر دقیقه، به مدت ۴ دقیقه، با استفاده از دیسپرس کننده اولترا تراکس T25 (IKA®-Werke GmbH & Co. KG، استافن، آلمان) انجام شد. امولسیون‌های به دست آمده، در همان روز آنالیز شدند، و به منظور تضمین تکرارپذیری روش، سه نمونه جداگانه برای هر تیمار آماده شده، و هر آزمون در سه تکرار انجام شد.

شاخص پلی دیسپرسیته و اندازه قطرات روغن امولسیون پیکرینگ با فاز داخلی بالا

اندازه قطرات روغن و شاخصه امولسیون‌ها، با استفاده از نانوبروک ۹۰ پلاس پالس (Brookhaven Instruments Corp., Holtsville, NY، آمریکا) آنالیز شده و نرم‌افزار آن میانگین قطر قطرات روغن و همچنین شاخص پلی دیسپرسیته میانگین را محاسبه کرد (ورژن ۵.۲۰).

ویژگی‌های امولسیون‌کنندگی امولسیون پیکرینگ با فاز داخلی بالا

شاخص فعالیت امولسیونی (EAI)، و شاخص پایداری امولسیونی (ESI) با استفاده از روش کدورت سنجی تعیین شدند (کرباسی و همکاران، ۲۰۲۱a). بلافاصله بعد از آماده سازی امولسیون‌ها، ۲۰ میکرولیتر از قسمت پایین بشر امولسیون‌هایی که به تازگی آماده شده بودند، برداشته شد و به ۶/۵ میلی لیتر آب مقطر که pH برابر با امولسیون داشت، و حاوی ۰/۱ گرم در ۱۰۰ گرم سولفات بود، اضافه شد (فاکتور رقیق سازی ۳۲۵). سپس این مخلوط برای ۱۰ ثانیه تحت همزنی قرار گرفت و پس از آن جذب هر نمونه در ۵۰۰ نانومتر خوانده شد. بعد از ۱۰ دقیقه، قسمت دیگری از امولسیون مد

از حرارت‌دهی، نمونه‌ها به سرعت در حمام آب و یخ خنک شدند و با استفاده از کیسه‌های دیالیز با وزن مولکولی ۱۴۰۰۰ دالتون، در آب مقطر دیالیز شدند (pH آب مقطر و نمونه‌ها یکسان بود). در نهایت نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سلسیوس، برای انجام آزمون‌های بعدی، نگهداری شدند. میکروژل پروتئین آب‌پنیر حرارت داده شده بدون حضور ساکارید، با عنوان WPM لیل زنی شد. برای تضمین تکرار پذیری روش، سه نمونه مجزا، برای هر ران آزمایش تهیه شد و هر آزمایش در سه تکرار انجام شد.

تعیین درجه اصلاح یا مزدوج شدن نمونه‌ها پس از واکنش میلارد

درجه مزدوج شدن نمونه‌ها با استفاده از روش "ارتوپتال-آلدهاید" (OPA) بررسی شد (کرباسی و همکاران ۲۰۲۱b). به طور خلاصه ۱۵۰ میکرولیتر از دیسپرسیون نمونه‌ها، با ۱۶/۵ میکرولیتر از معرف OPA ترکیب شد. بعد از هم‌زنی نمونه‌ها در تاریکی به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند و سپس جذب آن‌ها در ۳۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. نمونه شاهد، با استفاده از آب مقطر به جای دیسپرسیون‌های میکروژل پروتئین آب‌پنیر تهیه شد. درجه مزدوج شدن (DG) با فرمول زیر تعیین گردید:

$$DG (\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\% \quad [1]$$

در اینجا A_0 بیانگر جذب نمونه قبل از مزدوج شدن، و A_1 جذب نمونه پس از مزدوج شدن می‌باشد.

اندازه‌گیری اندازه ذرات و پتانسیل زتا نمونه‌ها پس از واکنش میلارد

اندازه ذرات و پتانسیل زتای نمونه‌ها با استفاده از پراکندگی نور دینامیکی (DLS) با استفاده از یک تحلیل کننده اندازه ذرات (هوریبا سری SZ-100Z، شرکت هوریبا، ژاپن) در دمای ۲۵ درجه سلسیوس اندازه‌گیری شد.

تعیین کشش سطحی نمونه‌ها پس از واکنش میلارد

کشش سطحی نمونه‌ها به عنوان تابعی از زمان توسط کشش سنج دیجیتالی (GmbH، Krüss K100، هامبورگ، آلمان) با

¹– High Internal Phase Pickering Emulsion

برشی (بر ثانیه) و اندیس رفتار جریان، که بدون بعد است، می‌باشند.

طیف سنجی تبدیل فوریه فروسرخ (FTIR) امولسیون پیکرینگ با فاز داخلی بالا

طیف FTIR نمونه‌ها با استفاده از اسپکترومتر بروکر (Equinox 55, Billerica, MA, USA) آنالیز شدند. طیف‌ها طی محدوده طول موجی ۶۰۰ تا ۴۰۰۰ بر سانتی‌متر، در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، جمع‌آوری گردید.

نتایج و بحث

درجه اصلاح یا مزدوج شدن نمونه‌ها پس از واکنش میلارد

جدول ۱ درجه اصلاح (مزدوج شدن)، اندازه ذرات و پتانسیل زتای ذرات میکروژل آب‌پنیر مزدوج‌نشده و مزدوج‌شده با اینولین، مالتودکسترین، و مخلوط این دو ساکارید را نشان می‌دهد. گلایکه کردن از طریق واکنش میلارد در واقع اتصال کوالان گروه کربنیل در

کربوهیدرات‌های احیاکننده با گروه آمین آزاد پروتئین است، که منجر به تشکیل باز شیف می‌گردد. در غیاب اینولین و مالتودکسترین، تغییرات ناچیزی در درجه اصلاح (مزدوج شدن) WPM وجود داشت (۱/۷٪). این تغییر کم و حداقلی، می‌تواند به دلیل واکنش پروتئین با مقادیر کم لاکتوز طبیعی در ایزوله پروتئین حین حرارت باشد، که منجر به مسدود شدن گروه آمین آزاد شده است. با اضافه شدن کربوهیدرات‌ها درجه اصلاح افزایش یافت که نشان‌دهنده اتصال کوالان پروتئین و ساکاریدها است.

نظر انتخاب و با روش قید شده مجدداً آزمون خوانش جذب انجام شد. شاخص فعالیت امولسیون (EAI)، و شاخص پایداری امولسیون (ESI) بر اساس معادلات ذیل تعیین گردید:

$$[2] \quad EAI (m^2/g) = \frac{4.606 \times A_0 \times 325}{C \times \varphi \times 10000}$$

$$[3] \quad ESI (\%) = \frac{A_{10}}{A_0} \times 100\%$$

در اینجا A_0 میزان جذب، درست بعد از همزنی (در زمان صفر) و A_{10} جذب نمونه پس از ۱۰ دقیقه است. C نشان‌دهنده غلظت پروتئین (گرم بر میلی‌لیتر) قبل از امولسیون‌سازی، و φ جزء حجمی (حجمی/حجمی) امولسیون است.

اندیس خامه‌ای شدن امولسیون پیکرینگ با فاز داخلی بالا اندیس خامه‌ای شدن هم برای بررسی پایداری سیستم‌های امولسیون و هم برای بررسی گسترش تجمع قطرات روغن استفاده می‌شود. برای اندازه‌گیری این پارامتر، امولسیون‌های تازه آماده شده، در لوله‌های آزمایش ۱۰ میلی‌لیتری ریخته شده، و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۳ ساعت نگه داشته شدند. اندیس خامه‌ای شدن طبق فرمول زیر محاسبه شد:

$$[4] \quad CI (\%) = \frac{H_1}{H_2} \times 100$$

در این معادله H_1 ارتفاع لایه سرمی و H_2 ارتفاع کل امولسیون است.

اندازه‌گیری ویسکوزیته امولسیون پیکرینگ با فاز داخلی بالا

ویسکوزیته ظاهری و ویژگی‌های جریان امولسیون‌ها با استفاده از ویسکومتر چرخشی (مدل LV-DV3T، شرکت مهندسی بروکفلید، آمریکا)، در ۲۵ درجه سلسیوس، با استفاده از سازگارکننده نمونه‌برداری کوچک با اسپیندل SC4-18 (ایزدی و امام جمعه ۲۰۱۵) اندازه‌گیری شد. نمونه‌ها در سیلندر ویسکومتر ریخته شده و تحت نرخ‌های برشی از ۱۰ تا ۲۸۰ بر ثانیه به گونه‌ای که طی بازه‌های ۸ ثانیه‌ای افزایش پیدا می‌کردند، قرار گرفت. سپس نتایج به دست آمده برای بررسی ویسکوزیته ظاهری و ویژگی‌های جریان نمونه‌ها با استفاده از معادله زیر و بر اساس مدل پاورلا برازش شدند:

$$[5] \quad \tau = K \cdot \dot{\gamma}^n$$

در این معادله τ ، K ، $\dot{\gamma}$ و n به ترتیب، نشان‌دهنده تنش برشی (پاسکال یا pa)، ضریب ثابت (پاسکال در ثانیه به توان n)، نرخ

Table 1- Degree of grafting (DG), zeta potential, and surface tension of unconjugated and conjugated WPMs in colloidal dispersions (WPM, whey protein microgel; In, inulin; Md, maltodextrin)

Samples	DG (%)	Z-Average (nm)	ζ-potential (mV)
WPM	1.70 ± 0.25	235.75 ± 51.4 ^d	-19.16 ± 0.43 ^a
WPM:Md	21.45 ± 1.22 ^b	454.17 ± 50.3 ^c	-22.63 ± 0.51 ^b
WPM:In:Md	23.66 ± 1.06 ^{ab}	542.61 ± 38.9 ^{ab}	-23.68 ± 0.22 ^c
WPM:In	25.38 ± 1.24 ^a	585.47 ± 41.6 ^a	-27.25 ± 0.42 ^d

Values are means ± standard deviation; values with different superscripts letters within a column differ significantly ($p < 0.05$).

pH برابر با ۷) نسبت به pH ایزوالکتریک میکروژل پروتئین آب‌پنیر (WPM) که در حدود ۵/۸ می‌باشد، بود. پس از واکنش میلارد پتانسیل زتای ذرات افزایش پیدا کرد. بالا بودن پتانسیل زتای ذرات کلئیدی، موجب بالا رفتن نیروی دافعه الکترواستاتیک و در نتیجه افزایش پایداری فیزیکی در pH‌های بالای نقطه ایزوالکتریک سیستم می‌شود (عباس‌زاده و همکاران ۱۴۰۳).

کشش سطحی نمونه‌ها پس از واکنش میلارد

از آنجا که کشش سطحی ارتباط نزدیکی با پایداری امولسیون‌ها در برابر کوالسنس یا ادغام دارد، برای ارزیابی عملکرد امولسیون‌سازی و ویژگی‌های بین‌سطحی امولسیفایرها، یک پارامتر مهم محسوب می‌گردد. همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است، همه نانومزدوج‌ها در مقایسه با آب (۷۲ میلی نیوتن بر متر) کشش سطحی را کاهش دادند که شاهدی بر فعالیت سطحی آن‌ها است.

این نانومزدوج‌ها طی جذب در سطح مشترک دو فاز، کاهش سریع در کشش سطحی را نشان دادند، که در ادامه، با کاهش کندتر تداوم داشت. این نتایج نشان داد، که افزودن کربوهیدرات، کشش سطحی را کاهش داد و با افزایش غلظت اینولین نسبت به مالتودکسترین کشش سطحی حتی بیشتر هم کاهش پیدا کرد (شکل ۱). گلایکه کردن پروتئین‌ها با کربوهیدرات‌ها منجر به کاهش معنی‌دار کشش سطحی می‌شود (تیرگاریان و همکاران، ۲۰۲۳). اتصال کوالان پلی‌ساکاریدها به میکروژل پروتئین آب‌پنیر، می‌تواند فیلم ضخیم‌تر و متراکم‌تری را در سطح مشترک روغن-آب بوجود آورد، که این امر باعث کاهش قابل توجه کشش سطحی می‌گردد.

از سوی دیگر درجه اصلاح (مزدوج شدن) WPM با اینولین نسبت به مالتودکسترین، افزایش بیشتری نشان داد. اینولین به دلیل طول زنجیره طولانی‌تر، پتانسیل بیشتری برای داشتن گروه‌های کربنیل آزاد دارد (چن و همکاران ۲۰۲۴) و قادر است گروه‌های آمین آزاد بیشتری را در مقایسه با مالتودکسترین درگیر کند.

قطر میانگین هیدرودینامیکی (Z) نمونه‌ها پس از واکنش میلارد

قطر میانگین هیدرودینامیکی (Z) ذرات نقش مهمی در تشکیل امولسیون پیکرینگ با فاز داخلی بالا و همچنین تعیین اندازه قطرات روغن در این امولسیون‌ها بازی می‌کنند. با اضافه شدن پلی‌ساکارید، اندازه ذرات میکروژل پروتئین آب‌پنیر (WPM) هم به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد. در این راستا، اینولین نسبت به مالتودکسترین تاثیر بیشتری در افزایش اندازه ذرات میکروژل به جا گذاشت. با اتصال پلی‌ساکارید به پروتئین بواسطه پیوند گلوکوزیدی، حجم ذرات و به دنبال آن قطر میانگین هیدرودینامیکی افزایش می‌یابد. در این میان، اینولین نسبت به مالتودکسترین، به دلیل طول زنجیره بزرگتر، فضای بیشتری از پیرامون ذرات میکروژل اشغال می‌کند و به طبع آن اندازه ذرات تشکیل شده نیز بزرگ‌تر می‌شود (جدول ۱).

پتانسیل زتا نمونه‌ها پس از واکنش میلارد

به غیر از اندازه ذرات، تعیین پروفایل حرکت الکتروفوریتیک هم برای فهم دافعه الکترواستاتیک که در پایداری امولسیون‌های پیکرینگ با فاز درونی بالا مهم هستند، ضروری می‌باشد. همه نمونه‌ها بار منفی نشان دادند که به دلیل بالاتر بودن pH نمونه‌ها

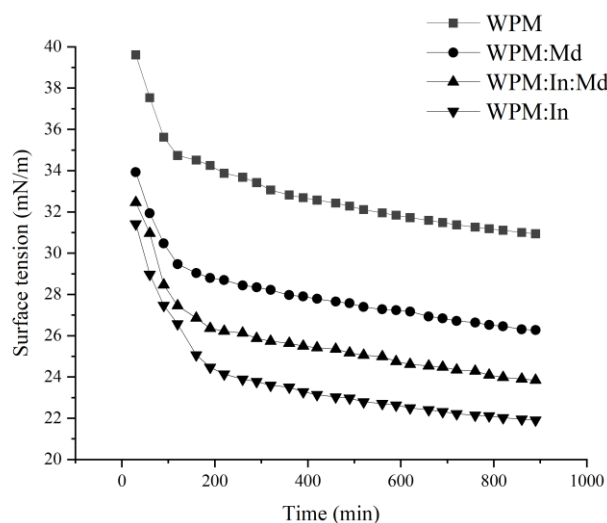


Figure 1- Surface tension as a function of time in unconjugated and conjugated WPMs in colloidal dispersions (WPM, whey protein microgel; In, inulin; Md, maltodextrin)

فعالیت سطحی آن‌ها کمک می‌کند (نوشکام و وریدی ۲۰۲۰). اینولین به دلیل ساختار فروکتوزی بیشتر، خاصیت آبدوستی بالاتری دارد. این خاصیت باعث می‌شود که اینولین بتواند در مرز میان فاز آبی و روغنی بهتر قرار بگیرد و در نتیجه به عنوان یک عامل پایدارکننده قوی‌تر عمل کند. مالتودکسترین که غالباً ساختاری از گلوکز دارد، تعاملات متفاوتی با فازهای آبی و روغنی دارد و نمی‌تواند به اندازه اینولین در کاهش کشش سطحی موثر باشد.

طیف سنجی زیر قرمز تبدیل فوریه FTIR

شکل ۲ پیک‌های جذبی FTIR مربوط به گروه‌های عملکردی اجزای مختلف امولسیون‌های پیکرینگ با فاز داخلی بالا را نشان می‌دهد.

در این میان اینولین نسبت به مالتودکسترین توانایی بیشتری در کاهش کشش سطحی از خود نشان داد که دلیل آن به تفاوت در ساختار مولکولی این دو ساکارید باز می‌گردد. اینولین به عنوان یک فروکتان و پلی‌ساکارید دارای ساختار زنجیره‌ای بلند و بدون شاخه است که به آن توانایی بهتری در پوشش سطح ذرات می‌دهد. این ویژگی موجب می‌شود که اینولین ضمن تعاملات بهتر با میکروژل پروتئین آب‌پنیر، به طور موثرتری سطح قطرات روغن را پوشش داده و کشش سطحی را بیشتر کاهش دهد. در مقابل، مالتودکسترین که زنجیره‌های کوتاه‌تر و نسبتاً شاخه‌دار دارد (کربوهیدرات)، نمی‌تواند به همان میزان سطح را پوشش دهد و در نتیجه تأثیر کمتری در کاهش کشش سطحی دارد.

تفاوت در حلالیت و آبدوستی این دو نیز از دلایل دیگر این موضوع است. حلالیت بهبود یافته نانومزدوج‌ها، به بهتر شدن

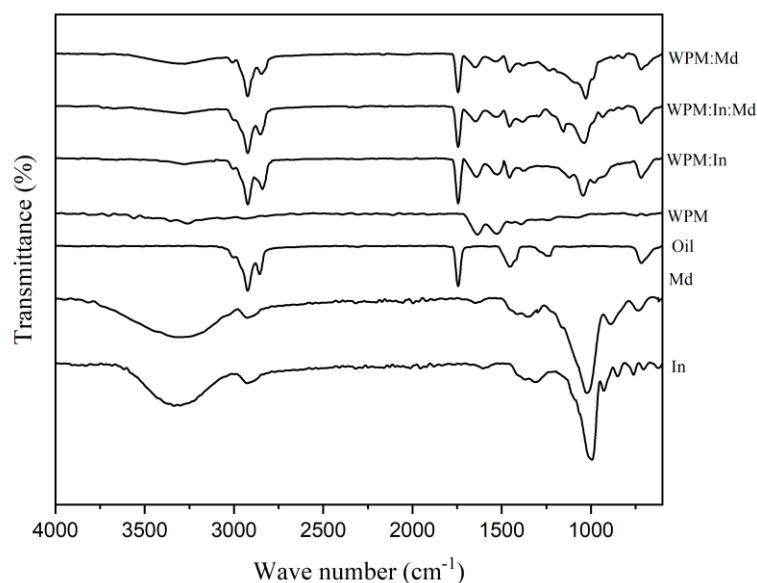


Figure 2- Fourier transform infrared spectra of HIPPEs stabilized by unconjugated and conjugated WPMs (WPM, whey protein microgel; In, inulin; Md, maltodextrin; HIPPEs, high internal phase Pickering emulsions)

پیرانوزها است، مربوط به ساکاریدها یعنی اینولین و مالتودکسترین می‌باشد (ماراسکا و همکاران، ۲۰۲۰). علاوه بر این دو پیک مجزا در حدود ۲۹۰۰ بر سانتی‌متر مربوط به روغن سویا و کربوهیدرات‌هایی است که در امولسیون‌های پیکرینگ وجود دارد. طیف‌های امولسیون و روغن، باندهای معمول مربوط به تری‌گلیسیریدها را نشان دادند که به طور معمول در روغن‌های خوراکی مشاهده می‌گردد. به خصوص یک سری پیک‌های مشخص مشاهده شد که یکی از آن‌ها در حدود ۷۰۰ بر سانتی‌متر بود و نشان‌دهنده ارتعاش خمشی بود، پیک دیگر در حدود ۱۷۰۰ بر سانتی‌متر بود که ارتعاش کششی $C=O$ را نشان می‌داد (ما و همکاران، ۲۰۲۳). قابل ذکر است که حضور باند در حدود ۳۰۰۰ بر سانتی‌متر نشان‌دهنده غیراشباعیت روغن (روغن سویا) می‌باشد (ونگ و همکاران، ۲۰۲۲).

اندازه قطرات روغن امولسیون‌های پیکرینگ با فاز داخلی بالا

با اضافه شدن ساکاریدها، اندازه قطرات روغن کاهش یافت. به طور کلی، اندازه قطرات روغن، با اندازه ذرات میکروژل در دیسپرسیون رابطه عکس دارد (ویجایا و همکاران ۲۰۱۷).

سه باند جذبی اصلی امولسیون‌ها ($WPM1:Md$ و $WPM:In:Md$ و $WPM:In$) از WPM یا میکروژل پروتئین آب‌پنیر نشأت گرفته‌اند. اولین پیک جذبی در حدود ۱۶۳۱ بر سانتی‌متر مشاهده شده که مربوط به آمید نوع اول یا ارتعاش کششی $C=O$ می‌باشد. باند جذبی بعدی که در حدود ۱۵۲۲ بر سانتی‌متر رؤیت شده مربوط به آمید نوع دوم ($amide II$) یا ارتعاش خمشی $C-N-H$ یا ارتعاش کششی $C-C$ و $C-N$ می‌باشد. در نهایت پیک سوم که در حدود ۱۲۲۰ بر سانتی‌متر مشاهده شده و مربوط به آمید نوع سوم ($amide III$) یا تغییر شکل درون صفحه‌ای $N-H$ می‌باشد (ما و همکاران، ۲۰۲۳). همزمان با کاهش نسبت پروتئین در نمونه‌ها، از شدت باندهای آمید نوع اول و دوم کاسته شد و پیک‌های مربوط به این پیوندها به طول موج‌های بلندتر انتقال یافت. تغییر در ویژگی‌های پیک‌ها احتمال ایجاد ارتعاش‌های کششی $C=N$ را تقویت می‌کند که این موضوع به دلیل تبدیل گروه‌های آمین به پیوندهای ایمین ($imine$) طی واکنش میلارد است (پنگ و همکاران، ۲۰۱۰). پیک مشخصه در حدود ۱۰۳۵ بر سانتی‌متر که در واقع ارتعاش کششی $C-O-C$ از اسکلت حلقه‌ای

اینولین بزرگ‌تر و پیچیده‌تر از مولکول‌های مالتودکسترین هستند. این اندازه بزرگ‌تر باعث می‌شود اینولین بتواند یک لایه محافظتی قوی‌تر در اطراف قطرات روغن ایجاد کرده و از ادغام آن‌ها جلوگیری کند. مخصوصاً اینولین‌های بلند زنجیر به دلیل وجود تعداد زیاد گروه‌های هیدروکسیل آزاد، خاصیت آب‌دوستی بالایی دارند (ژانگ و همکاران ۲۰۲۴)، و هنگامی که با میکروژل پروتئین آب‌پنیر اتصال کووالانی برقرار می‌کنند، نواحی آبریز پروتئین در داخل فاز پراکنده نگه داشته می‌شوند، در حالی که ساکاریدهایی که به صورت کووالان به آن‌ها وصل شده‌اند، فاز پیوسته را جذب می‌کنند و باعث تشکیل یک فیلم کندانس شده ضخیم و پایدار در اطراف قطرات روغن می‌گردند (کرباسی و همکاران، ۲۰۱۸؛ وستر و همکاران، ۲۰۰۶).

شاخص پایداری امولسیون‌های پیکرینگ با فاز داخلی بالا شاخص پایداری همه امولسیون‌های پیکرینگ با فاز داخلی بالایی که با WPM مزدوج شده پایدار شده بودند، در مقایسه با امولسیونی که با WPM مزدوج نشده تولید شده بود، بهبود یافت (جدول ۲). بخصوص نمونه WPM:In بیشترین پایداری بین سطحی را نشان داد. در میان نمونه‌های مزدوج شده، نمونه WPM:Md کمترین پایداری را به نمایش گذاشت. به طور کلی مولکول‌های مالتودکسترین در مقایسه با اینولین، کوچکتر و ساده‌تر هستند و در نتیجه، لایه محافظتی ضعیف‌تری ایجاد می‌کنند.

هرچقدر اندازه ذرات دیسپرسیون در امولسیون‌های پیکرینگ بزرگتر باشد، فضای بیشتری اشغال می‌کنند، و فضای قابل مانور کمتری در اختیار مولکول‌های روغن قرار می‌گیرد و این باعث کاهش اندازه ذرات روغن می‌گردد (هرناندز-رودریگز و همکاران ۲۰۲۴). قطرات کوچکتر پایداری بیشتری دارند و کمتر تمایل به ادغام دارند. اندازه ذرات تأثیر بسیاری بر پایداری امولسیون دارند (عباس‌زاده و همکاران ۱۴۰۳). بررسی شاخص‌های فعالیت امولسیونی و پایداری امولسیون نیز نتایجی هم‌راستا با این موضوع را نشان داد.

شاخص فعالیت امولسیون‌های پیکرینگ با فاز داخلی بالا شاخص فعالیت امولسیون‌های پیکرینگ با فاز داخلی بالا که با میکروژل‌های پروتئین آب‌پنیر مزدوج شده (WPM) با ساکارید پایدار شده بودند نسبت به نمونه‌ای که با WPM مزدوج نشده (فاقد کربوهیدرات)، تولید شده بود، بیشتر بود. این امر نشان‌دهنده افزایش این شاخص همراه با افزودن ساکارید است. این بهبود احتمالاً به دلیل اتصال کووالان پلی‌ال‌ها است که باعث شده‌اند WPM از نظر سطحی فعال‌تر شده و بتواند در سطح مشترک روغن-آب جذب شود (جیانگ و همکاران ۲۰۲۴). همچنین در مقایسه اینولین با مالتودکسترین، میکروژل‌های پروتئین آب‌پنیر مزدوج شده با اینولین فعالیت امولسیونی بهتری نسبت به میکروژل‌های مزدوج شده با مالتودکسترین نشان دادند. این موضوع که در مقایسه پایداری امولسیون‌ها نیز مشاهده شد، احتمالاً مربوط به ساختار مولکولی اینولین است. مولکول‌های

Table 2- Volume-weighted mean diameter ($D_{4,3}$), polydispersity index (PDI), emulsification activity index (EAI), emulsification stability index (ESI), consistency coefficient (K), and flow behavior index (n) of HIPPEs stabilized by unconjugated and conjugated WPMs (WPM, whey protein microgel; In, inulin; Md, maltodextrin; HIPPEs, high internal phase Pickering emulsions)

HIPPEs	Emulsifying properties				Rheological parameters	
	$D_{4,3}$ (μm)	PDI	EAI (m^2/g)	ESI (%)	K (mPa.s)	n
WPM	11.8 ± 0.4^a	0.68 ± 0.08^a	9.52 ± 0.9^d	79.45 ± 0.6^d	160.3 ± 40^d	0.93 ± 0.05^{ab}
WPM:Md	9.6 ± 0.4^b	0.45 ± 0.04^b	27.46 ± 2.4^c	84.31 ± 0.8^c	304.9 ± 30^{bc}	0.93 ± 0.02^{ab}
WPM:In:Md	9.3 ± 0.2^{bc}	0.38 ± 0.03^c	31.61 ± 1.1^b	86.09 ± 0.4^b	330.6 ± 25^b	0.93 ± 0.02^{ab}
WPM:In	8.9 ± 0.3^d	0.31 ± 0.03^d	42.18 ± 3.7^a	87.32 ± 0.5^a	380.4 ± 26^a	0.94 ± 0.01^a

Values are means \pm standard deviation; values with different superscripts letters within a column differ significantly ($p < 0.05$).

می‌تواند بر نیروهای جاذبه و دافعه بین ذرات و در نتیجه بر ساختار شبکه‌ای که تشکیل می‌دهند تأثیر بگذارد، بررسی پتانسیل زتا نشان داد با اضافه شدن اینولین، بار سطحی نیز افزایش می‌یابد. شبکه سه‌بعدی تشکیل شده توسط اینولین باعث توزیع یکنواخت‌تر قطرات روغن در فاز آبی می‌شود و از تجمع آن‌ها جلوگیری می‌کند. این امر به افزایش ضریب یکنواختی امولسیون کمک می‌کند. آنالیز رفتار جریان امولسیون‌ها نشان داد که این مواد رفتار رقیق شونده با برش (Shear thinning) محدودی دارند؛ به شکلی که مقدار (n) ، در همه امولسیون‌ها، کمتر از عدد یک است (جدول ۲).

اندیس خامه‌ای امولسیون پیکرینگ با فاز داخلی بالا

همانگونه که در شکل ۳ نشان داده شده است، با اضافه شدن ساکارید، همچنین با افزایش نسبت اینولین و کاهش مالتودکسترین، اندیس خامه‌ای شدن امولسیون‌ها کاهش یافت. احتمالاً این موضوع مربوط به دانسیته افزایش یافته قطرات روغن، و همچنین افزایش متعاقب ویسکوزیته امولسیون‌ها در حضور ساکارید می‌باشد (ویجایا و همکاران ۲۰۱۷). افزایش در ویسکوزیته امولسیون‌های پیکرینگ با فاز داخلی بالا که با مزدوج-ها پایدار شده است (جدول ۲) تأثیر مثبت واکنش میلارد در بهبود شاخص پایداری و خامه‌ای شدن امولسیون‌ها را حمایت و تأیید می‌کند.

نسبت به پروتئین‌های اصلاح نشده، پروتئین‌های گلاایکه شده تمایل به تشکیل لایه‌های اینترفیس ضخیم‌تری در اطراف قطرات روغن دارند که منجر به دافعه فضایی عالی بین قطره‌ها شده و همچنین پایداری کلی را افزایش داده است (کرباسی و عسکری، ۲۰۲۱). شاخص پایداری امولسیون کمتر در نمونه مزدوج نشده، می‌تواند مربوط به پوشش ناکافی مساحت اینترفیسی باشد که منجر به تشکیل لایه‌های اینترفیسی اطراف قطرات روغن می‌شود و متعاقباً باعث آگلومره شدن و ناپایداری امولسیون می‌شود (ووستر و آگوستین، ۲۰۰۶).

ویسکوزیته امولسیون‌های پیکرینگ با فاز داخلی بالا

بررسی ویسکوزیته نمونه‌ها نشان داد که با اضافه شدن ساکارید و مزدوج شدن با پروتئین، ضریب یکنواختی و ویسکوزیته نمونه‌ها افزایش می‌یابد. همان‌طور که در جدول ۲ پیداست، در این راستا اینولین تأثیر قوی‌تری نسبت به مالتودکسترین در افزایش این دو فاکتور به جا گذاشت. کاهش اندازه قطرات روغن معمولاً منجر به افزایش سطح تماس بین فازها و در نتیجه افزایش ویسکوزیته می‌شود. این همان اتفاقی است که به دنبال افزایش اندازه ذرات دیسپرسیون روی می‌دهد. به طور کلی ذرات کلئیدی بزرگتر، انرژی دافعه بیشتری دارند و این باعث می‌شود که برای تجمع در لایه سطحی روغن-آب کاربردی‌تر باشند و به همین دلیل پایدارکننده بهتری برای امولسیون به حساب می‌آیند. همچنین بار سطحی ذرات

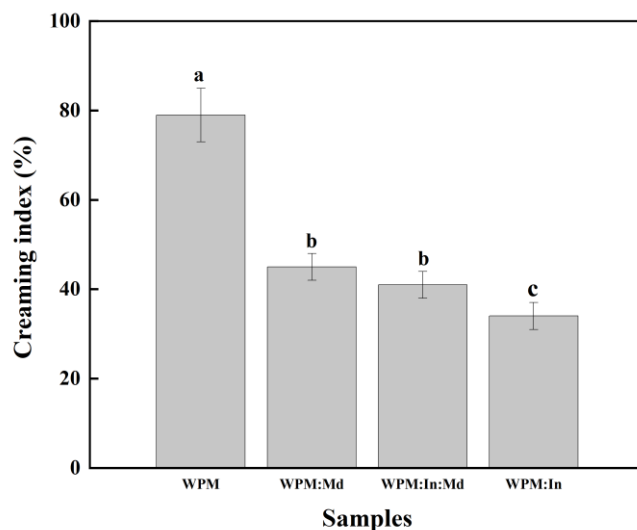


Figure 3- Creaming index of HIPPEs stabilized by unconjugated and conjugated WPMs (WPM, whey protein microgel; In, inulin; Md, maltodextrin; HIPPEs, high internal phase Pickering emulsions). Means with different lowercase superscripts differ significantly ($p < 0.05$).

نتیجه‌گیری

فضایی بیشتر، کشش سطحی کمتر، و ایجاد لایه‌های پایدارتر در مرز بین سطحی آب و روغن می‌شود. به طور کلی، این تحقیق نشان‌دهنده پتانسیل بالای واکنش میلارد برای بهبود عملکرد امولسیون‌ها و افزایش کارایی امولسیفایری پروتئین‌های طبیعی به کمک اتصال آن‌ها با ساکاریدها است. مزدوج‌سازی نانوذرات پروتئین آب‌پنیر با اینولین و مالتودکسترین می‌تواند به عنوان یک رویکرد مؤثر برای تولید امولسیون‌های پیکرینگ پایدار و دارای ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی مطلوب در صنایع غذایی، دارویی، و آرایشی مورد استفاده قرار گیرد. استفاده از امولسیون‌های پیکرینگ، به عنوان پیش‌ساز یا اجزای محصولات دیگر مانند اولئوژل‌ها، می‌تواند زمینه‌ساز فعالیت‌های جدید و نوآورانه بعدی باشد.

استفاده از مزدوج‌های میکروژل پروتئین آب‌پنیر با اینولین و مالتودکسترین از طریق واکنش میلارد، به طور مؤثری به تولید امولسیون‌های پیکرینگ با فاز پراکنده بالا کمک می‌کند. اتصال کووالانسی پلی‌آل‌ها باعث شد WPM از نظر سطحی فعال‌تر شده و در سطح مشترک روغن-آب جذب شود بررسی‌های انجام‌شده نشان داد که در میان ترکیبات مورد بررسی، مزدوج‌های حاوی اینولین اثر بیشتری در بهبود خواص امولسیونی و پایداری امولسیون از خود نشان دادند. این تفاوت عملکردی را می‌توان به طول زنجیره مولکولی بیشتر اینولین در مقایسه با مالتودکسترین نسبت داد که منجر به ایجاد دافعه

Reference

- Abbaszadeh, F., Aalami, M., Kadkhodaei, R., Maghsoudlou, Y., and Sadeghi Mahoonak, A. 2023. Application of Pickering emulsion stabilized with soy protein nanoparticles in the formulation of gluten-free cake and evaluation of its quality indicators. *Food Research Journal*, 34(1): 15-33.
- Burger, T. G., and Zhang, Y. 2019. Recent progress in the utilization of pea protein as an emulsifier for food applications. *Trends in Food Science & Technology*, 86, 25-33.
- Chen, Q., Wang, X., Wang, Y., Guo, T., Guan, P., Hou, J., and Chen, Z. 2024. Effects of inulin with different polymerization degrees on the structural and gelation properties of potato protein. *Food Chemistry: X*, 22, 101405.

- Cheon, J., Haji, F., Baek, J., Wang, Q., and Tam, K. C. 2023. Pickering emulsions for functional food systems. *Journal of Agriculture and Food Research*, 11, 100510.
- Chronakis, L. S. 1998. On the molecular characteristics, compositional properties, and structural-functional mechanisms of maltodextrins. *Critical Reviews in Food Science*, 38(7): 599-637.
- Dokic, P., Jakovljevic, J., and Dokic-Baucal, L. J. 1998. Molecular characteristics of maltodextrins and rheological behaviour of diluted and concentrated solutions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 141(3): 435-440.
- Hernandez-Rodriguez, G., Tenorio-Garcia, E., Ettelaie, R., Lishchuk, S. V., Harbottle, D., Murray, B. S., and Sarkar, A. 2024. Demulsification of Pickering emulsions: advances in understanding mechanisms to applications. *Soft Matter*.20: 7344-7356.
- Jiang, Z., Luo, H., Huangfu, Y., Gao, Y., Zhang, M., Bao, Y., and Ma, W. 2024. High internal phase emulsions stabilized by whey protein covalently modified with carboxymethyl cellulose: Enhanced environmental stability, storage stability and bioaccessibility. *Food Chemistry*, 436, 137634.
- Karbasi, M., and Askari, G. 2021. Modification of whey protein microgel particles with mono-oligo- and polysaccharides through the Maillard reaction: Effects on structural and techno-functional properties. *Food Structure*, 28, 100184.
- Karbasi, M., Askari, G., and Madadlou, A. 2019. Surface decoration of whey protein microgels through the Maillard conjugation with maltodextrin. *Food Hydrocolloids*, 91: 190–197.
- Karbasi, M., Sánchez-Ferrer, A., Adamcik, J., Askari, G., Madadlou, A., and Mezzenga, R. 2021b. Covalent β -lactoglobulin-maltodextrin amyloid fibril conjugate prepared by the Maillard reaction. *Food chemistry*, 342, 128388.
- Karimi, M., Habibi Rezaei, M., and Sadeghi, R. 2016. Possibility of using endo-inulinase with high thermal stability to produce high fructose syrup from inulin. *Food Research Journal*, 28(1): 15-25.
- Li, Y., Zou, Y., Que, F., and Zhang, H. 2022. Recent advances in fabrication of edible polymer oleogels for food applications. *Current Opinion in Food Science*, 43: 114-119.
- Naji-Tabasi, S., Mahdian, E., Arianfar, A., and Naji-Tabasi, S. 2020. Investigation of Oleogel Properties Prepared by Pickering Emulsion Templated Stabilized with Solid Particles of Basil Seed Gum and Isolated Soy Protein as a Fat Substitute in Cream. *JRIFST*. 9 (3): 269-282.
- Nooshkam, M., and Varidi, M. 2020. Whey protein isolate-low acyl gellan gum Maillard-based conjugates with tailored technological functionality and antioxidant activity. *International Dairy Journal*, 109, 104783.
- Paglarini, C. D. S., Vidal, V. A. S., Martini, S., Cunha, R. L., and Pollonio, M. A. R. 2022. Protein-based hydrogelled emulsions and their application as fat replacers in meat products: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(3): 640-655.
- Raftani Amiri, Z., Mahmudi, M.J., and Alimi, M. 2013. Effect of maltodextrin as a fat replacer on the quality of non-fat yogurt. *Food Research Journal*, 23(1): 133-142.
- Shabir, I., Dar, A. H., Dash, K. K., Srivastava, S., Pandey, V. K., Manzoor, S., and Bashir, I. 2023. Formulation, characterization, and applications of organic Pickering emulsions: A comprehensive review. *Journal of Agriculture and Food Research*, 100853.
- Tavasoli, S., Maghsoudlou, Y., Jafari, S.M., and Shahiri Tabarestani, H. 2022. Fabrication of stable Pickering emulsion using hybrid particles comprised of biopolymers. *Food Processing and Preservation Journal*. 15 (1): 109-124.
- Tirgarian, B., Farmani, J., Farahmandfar, R., Milani, J. M., and Van Bockstaele, F. 2023. Colloidal network oleogels structured by sonothermal conjugates of sodium caseinate and anionic gums. *Food Hydrocolloids*, 140, 108624.
- Wijaya, W., Van der Meeren, P., Wijaya, C. H., and Patel, A. R. 2017. High internal phase emulsions stabilized solely by whey protein isolate-low methoxyl pectin complexes: Effect of pH and polymer concentration. *Food & function*, 8(2): 584-594.

- Wu, J., Shi, M., Li, W., Zhao, L., Wang, Z., Yan, X., and Li, Y. 2015. Pickering emulsions stabilized by whey protein nanoparticles prepared by thermal cross-linking. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 127: 96-104.
- Yu-Tong, D., Chun, C., Yue-Ming, J., Bao, Y., and Xiong, F. 2022. Glycosylation with bioactive polysaccharide obtained from *Rosa roxburghii* Tratt fruit to enhance the oxidative stability of whey protein isolate emulsion. *International journal of biological macromolecules*, 218: 259-268.
- Zhang, R., Luo, D., Yue, C., Bai, Z., Li, P., Wang, L., and Han, S. 2024. Effects of phosphorylation-modified long-chain inulin on wheat starch: Physicochemical properties and retrogradation behaviors. *Food Chemistry: X*, 24, 101860.