

Journal Pre-proofs

Food-Grade Saffron Nanoemulsion with Ultrafine Particles: Process and Formulation Optimization for Maximum Transparency and Stability

Fariborz Mansouri, Akbar Mohammadi Zardkhoshoui

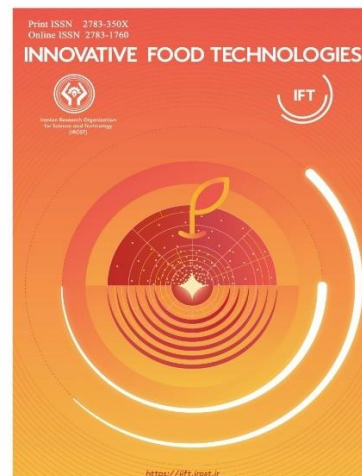
DOI: <https://doi.org/10.22104/ift.2026.8272.2296>

To appear in: Innovative Food Technologies (IFT)

Received Date: 28 May 2026

Revised Date: 03 June 2026

Accepted Date: 11 July 2026



Please cite this article as: Fariborz Mansouri, Akbar Mohammadi Zardkhoshoui, Food-Grade Saffron Nanoemulsion with Ultrafine Particles: Process and Formulation Optimization for Maximum Transparency and Stability, *Innovative Food Technologies* (2026), doi: <https://doi.org/10.22104/ift.2026.8272.2296>

This is a PDF file of an article that has undergone enhancements after acceptance, such as the addition of a cover page and metadata, and formatting for readability, but it is not yet the definitive version of record. This version will undergo additional copyediting, typesetting and review before it is published in its final form, but we are providing this version to give early visibility of the article. Please note that, during the production process, errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

© 2026 The Author(s). Published by iroast.org.

نانوامولسیون خوراکی زعفران با اندازه ذرات فوق ریز: بهینه سازی فرآیند و فرمولاسیون برای دستیابی به حداکثر شفافیت و پایداری

فریبرز منصوری^{۱*}، اکبر محمدی زردخوشی^{۱*}

^۱استادیار پژوهشکده فناوری های شیمیایی، سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران

رایانامه: f.mansouri@irost.ir

چکیده

هدف از این پژوهش، طراحی، فرمولاسیون و بهینه سازی نانوامولسیون خوراکی اسانس زعفران بر پایه آب بود. برای شناسایی ترکیب بهینه امولسیفایر و کمک امولسیفایر، تأثیر طیف گسترده ای از امولسیفایرها (توین ۸۰، صمغ عربی، لسیتین، پروتئین آب پنیر، نشاسته اصلاح شده، Brij35 و اسپان ۲۰) و کمک امولسیفایرها (پروپیلن گلیکول، گلیسرین و اتانول) بر پایداری و شفافیت ارزیابی شد. نتایج نشان داد که ترکیب توین ۸۰ و پروپیلن گلیکول کارآمدترین سیستم است. در مرحله بعد، با روش سطح پاسخ، تأثیر غلظت توین ۸۰، پروپیلن گلیکول، اسانس زعفران، توان و زمان اولتراسوند بر پاسخ های اندازه ذرات، پتانسیل زتا، شفافیت و پایداری بررسی گردید. فرمولاسیون بهینه شامل ۱۰ درصد توین ۸۰، ۹ درصد پروپیلن گلیکول و ۳.۵ درصد اسانس زعفران با توان ۳۶۰ وات و زمان ۱۵۰ ثانیه بود. نانوامولسیون بهینه دارای میانگین اندازه ذرات ۱۴.۷ نانومتر، پتانسیل زتا ۴۵.۱۸- میلی ولت، شفافیت ۹۳.۱ درصد و پایداری ۱۰۰ درصد بود. آزمون های پایداری شتاب یافته (۴ هفته در ۴۵ درجه سانتی گراد و پاستوریزاسیون در ۷۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه) پایداری مطلوب را نشان داد. آنالیز GC-MS حضور ۲۹.۵۲ درصد سافرانال را تأیید کرد. ارزیابی حسی نشان داد نانوامولسیون در مقایسه با اسانس غیرامولسیونی برتری معناداری در مطلوبیت بو، طعم و پذیرش کلی دارد. همچنین نانوامولسیون در برابر انجماد (۱۸- درجه سانتی گراد)، pH (۲ و ۹) و الکترولیت (۲۰۰ NaCl) میلی مولار) پایداری کامل نشان داد. این پژوهش نشان داد با بهینه سازی سیستماتیک می توان نانوامولسیونی با ریزترین قطرات، شفافیت استثنایی و پایداری برتر تولید کرد که قابلیت کاربرد گسترده در صنایع غذایی به ویژه نوشیدنی های شفاف را دارد.

واژه های کلیدی: نانوامولسیون، زعفران، فراصوت، بهینه سازی، پایداری، ارزیابی حسی

۱-مقدمه

اسانس ها ترکیبات معطری هستند که به طور طبیعی توسط گیاهان تولید شده و در اندام های مختلف آن ها ذخیره می شوند (Shen et al., 2024). این ترکیبات به دلیل دارا بودن عطر و طعم منحصر به فرد، کاربرد گسترده ای در صنایع غذایی، دارویی و آرایشی-بهداشتی یافته اند (McClements, 2020). در این میان، زعفران به عنوان گران بها ترین ادویه جهان، منبعی ارزشمند برای استخراج اسانس طبیعی با عطر و طعمی بی نظیر است (Cardoso-Ugarte & Sosa-Morales, 2022). ترکیبات اصلی اسانس زعفران شامل سافرانال (عامل عطر اصلی)، پیکروکروسین (عامل طعم) و کروسین (عامل رنگ) می باشند (Moradi & Kousheh, 2024). با این حال، استفاده مستقیم از اسانس زعفران در بسیاری از سیستم های غذایی، به ویژه محصولات پایه آبی مانند نوشیدنی ها، با چالش های عمده ای مواجه است. ماهیت چربی دوستی و نامحلول بودن در آب، فراریت بالا و حساسیت سافرانال (به عنوان مهم ترین ترکیب معطر) به اکسیداسیون و تخریب حرارتی از مهم ترین محدودیت های کاربرد این اسانس ارزشمند محسوب می شوند (Jafari & McClements, 2018). روش های سنتی برای رفع این محدودیت ها، مبتنی بر استفاده از حلال ها و فیلر های آلی مانند تری استین، روغن های پایه و پروپیلن گلیکول بوده است (McClements & Jafari, 2018). در این رویکرد، اسانس

ابتدا در این حلال‌ها حل شده و سپس به محصول نهایی افزوده می‌شود. اگرچه این روش امکان استفاده از اسانس را فراهم می‌کند، اما معایب قابل توجهی از جمله افزایش هزینه تمام‌شده محصول، کاهش شدت و خلوص عطر و طعم اصلی اسانس و پایداری فیزیکی و شیمیایی محدود در طول زمان را به همراه دارد (Assadpour & Jafari, 2019). از این رو، یافتن راهکارهایی برای افزایش پایداری اسانس زعفران در محیط‌های غذایی و کنترل رهایش ترکیبات معطر آن در زمان مطلوب، از اهمیت به‌سزایی برخوردار است (Gahruie et al., 2020).

در سال‌های اخیر، فناوری نانوامولسیون‌سازی به عنوان یک راهکار نوین و کارآمد برای غلبه بر این محدودیت‌ها مطرح شده است (Kumar et al., 2022). نانوامولسیون‌ها سامانه‌های کلوئیدی ناهمگن متشکل از دو مایع غیرقابل امتزاج هستند که قطر قطرات پراکنده در آنها معمولاً در محدوده ۲۰ تا ۲۰۰ نانومتر قرار دارد (Solans et al., 2005; Tadros et al., 2004). این سامانه‌ها به دلیل اندازه بسیار ریز قطرات، از ویژگی‌های منحصربه‌فردی برخوردارند. نخست، زمانی که اندازه ذرات از یک‌چهارم طول موج نور مرئی (حدود ۱۰۰ نانومتر) کوچک‌تر باشد، نور بدون پراکندگی قابل توجه از محیط عبور می‌کند و در نتیجه نانوامولسیون‌ها به صورت شفاف یا نیمه‌شفاف قابل مشاهده هستند (Arteaga et al., 2023). این ویژگی برای کاربرد در محصولات ماندن نوشیدنی‌های شفاف، آب‌های طعم‌دار و شربت‌های زلال که شفافیت یک پارامتر کلیدی کیفی محسوب می‌شود، حیاتی است (Tastan & Baysal, 2022). دوم، نانوامولسیون‌ها به دلیل نسبت سطح به حجم بسیار بالا، قابلیت افزایش زیست‌فراهمی و رهایش کنترل‌شده ترکیبات زیست‌فعال را دارا هستند (Salvia-Trujillo et al., 2020). سوم، این سامانه‌ها به دلیل کاهش اندازه قطرات و افزایش نسبت سطح به حجم که منجر به بهبود پوشش سطحی توسط امولسیفایرها و ایجاد پایداری استریک و الکترواستاتیک می‌شود، از پایداری سینتیکی بالایی در برابر پدیده‌های ناپایدارکننده مانند خامه‌ای شدن، لخته شدن، ادغام قطرات و رسیدن اسوالد برخوردارند (Rao & McClements, 2012; McClements, 2021). با این حال، برخلاف میکروامولسیون‌ها که سامانه‌های تعادلی و ترمودینامیکی پایدار هستند، نانوامولسیون‌ها سامانه‌های غیرتعادلی محسوب می‌شوند که به طور خودبه‌خودی تشکیل نمی‌شوند و برای تولید آنها نیاز به اعمال انرژی مکانیکی است (Gupta et al., 2016).

امروزه روش‌های مختلفی برای تولید نانوامولسیون‌ها وجود دارد که به دو دسته کلی روش‌های با انرژی بالا و روش‌های با انرژی پایین تقسیم می‌شوند (Karthik et al., 2017). روش‌های با انرژی پایین مانند روش وارونگی فاز و امولسیون‌سازی خودبه‌خودی، اگرچه به تجهیزات ساده‌تری نیاز دارند، اما اغلب به غلظت‌های بالای سورفکتانت وابسته بوده و دامنه کاربرد محدودتری دارند (Bouchemal et al., 2004). در مقابل، روش‌های با انرژی بالا شامل هموژنیزاسیون فشار بالا، میکروفولئویدایزر و امولسیون‌سازی با امواج فراصوت هستند که با اعمال نیروهای برشی شدید، قطرات درشت را به ابعاد نانومتری تبدیل می‌کنند (Lee & Norton, 2022).

هموژنیزاسیون فشار بالا یکی از رایج‌ترین روش‌ها در صنایع غذایی است که در آن امولسیون خام با فشار ۵۰ تا ۲۵۰۰ بار از یک دریچه عبور داده می‌شود (Floury et al., 2004). با این حال، این روش معایبی از جمله نیاز به تجهیزات گران‌قیمت، تولید حرارت بالا در حین فرآیند و محدودیت در تولید حجم‌های کوچک در مقیاس آزمایشگاهی دارد (Schultz et al., 2021). میکروفولئویدایزر نیز با عبور دادن امولسیون از میکروکانال‌های با طراحی خاص، قادر به تولید قطرات بسیار ریز است، اما حساسیت به گرفتگی کانال‌ها و هزینه بالای نگهداری از محدودیت‌های آن محسوب می‌شود (Jafari et al., 2007).

در این میان، فناوری فراصوت (اولتراسوند) به عنوان یک روش کارآمد، مقرون‌به‌صرفه و با قابلیت تولید نانوامولسیون‌های با اندازه قطرات بسیار ریز و توزیع باریک، توجه بسیاری از محققان را به خود جلب کرده است (Kentish et al., 2008; Li & Chiang, 2012). در این روش، امواج فراصوت با بسامد معمول ۲۰ کیلوهرتز با ایجاد پدیده کاویتاسیون (تشکیل، رشد و فروپاشی حباب‌های میکروسکوپی در مایع) نیروهای برشی شدید، امواج ضربه‌ای و جریان‌های آشفتنه موضعی ایجاد می‌کند (Canselier et al., 2002). در لحظه فروپاشی حباب‌ها، دما و فشار موضعی به ترتیب به حدود ۵۰۰۰ درجه کلین و ۱۰۰۰ اتمسفر می‌رسد که انرژی کافی برای شکستن قطرات درشت به ذرات نانومتری را فراهم می‌آورد (Suslick, 2020). مزایای اصلی این روش شامل مصرف

انرژی نسبتاً پایین، قابلیت تولید در مقیاس‌های مختلف (از آزمایشگاهی تا صنعتی)، عدم نیاز به تجهیزات پیچیده و امکان تولید نانومولسیون‌های با توزیع اندازه ذرات بسیار باریک و یکنواخت است (Abismail et al., 1999). پارامترهایی مانند توان فراصوت، زمان صوت‌دهی و دمای فرآیند تأثیر مستقیمی بر ویژگی‌های نهایی نانومولسیون دارند و بهینه‌سازی آن‌ها برای دستیابی به حداکثر کارایی ضروری است (Carpenter & Saharan, 2017; Silva et al., 2012).

اهمیت دستیابی به ابعاد بسیار ریز قطرات (به ویژه زیر ۵۰ نانومتر) در نانومولسیون‌های خوراکی ناشی از پیامدهای مطلوب متعددی است. اولاً، کاهش اندازه قطرات منجر به افزایش چشمگیر نسبت سطح به حجم می‌شود که این امر بهبود رهایش ترکیبات معطر و افزایش شدت طعم درک‌شده توسط مصرف‌کننده را به همراه دارد (Salvia-Trujillo et al., 2015). ثانیاً، با کاهش اندازه قطرات به زیر ۵۰ نانومتر، پراکندگی نور (پدیده رایلی) به شدت کاهش یافته و شفافیت نهایی محصول به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد (Mason et al., 2006). ثالثاً، ذرات ریزتر دارای تحرک براونی بیشتری بوده و نیروی گرانشی مؤثر بر آن‌ها کاهش می‌یابد که این امر پایداری در برابر جدایش فازی (خامه‌ای شدن یا رسوب) را به طور چشمگیری بهبود می‌بخشد (Wooster et al., 2008). با این حال، دستیابی به ابعاد زیر ۵۰ نانومتر در مولسیون‌های خوراکی یک چالش فنی قابل توجه است، زیرا نیازمند تعادل ظریف میان انرژی ورودی، نوع و غلظت امولسیفایر، نسبت فازها و شرایط فرآیندی می‌باشد (Koroleva & Yurtov, 2022). کاهش بیش از حد اندازه ذرات می‌تواند با افزایش سطح تماس، نیاز به امولسیفایر بیشتری برای پوشش کامل سطح ایجاد کند و در صورت عدم تأمین این نیاز، منجر به ناپایداری و ادغام قطرات گردد (Guttoff et al., 2015). همچنین، اعمال انرژی بیش از حد می‌تواند با تخریب امولسیفایر و ایجاد قطرات بسیار ریز که تمایل به ادغام مجدد دارند، نتیجه معکوس به همراه داشته باشد (Jafari et al., 2008). بنابراین، طراحی سیستماتیک و بهینه‌سازی همزمان فرمولاسیون و پارامترهای فرآیند برای دستیابی به چنین ابعاد نانومتری ظریف و در عین حال پایداری مطلوب، یک ضرورت علمی و فنی محسوب می‌شود.

انتخاب امولسیفایر مناسب نیز نقشی حیاتی در تعیین ویژگی‌های نهایی سامانه‌های نانومولسیونی دارد (Dickinson, 2009). امولسیفایرها با کاهش کشش سطحی در فصل مشترک روغن و آب، تشکیل قطرات ریز را تسهیل کرده و با ایجاد سد فیزیکی یا الکترواستاتیکی از ادغام آن‌ها جلوگیری می‌کنند (Israelachvili, 2011). عدد تعادل آب‌دوستی-چربی دوستی (HLB) یکی از مهم‌ترین معیارها برای انتخاب امولسیفایر مناسب است. برای تشکیل امولسیون‌های روغن در آب (O/W)، استفاده از امولسیفایرهایی با HLB بین ۸ تا ۱۸ توصیه می‌شود (Griffin, 1954). از جمله امولسیفایرهای پرکاربرد در صنایع غذایی می‌توان به توپین ۸۰ (پلی‌سوربات ۸۰) با HLB حدود ۱۵، لسیترین، صمغ عربی، نشاسته اصلاح‌شده و پروتئین آب پنیر اشاره کرد (Choi et al., 2009; Salvia-Trujillo et al., 2014). در این میان، استفاده از کمک‌امولسیفایرهایی مانند پروپیلن گلیکول می‌تواند با افزایش انحلال‌پذیری اجزای لیپوفیلیک در فاز آبی و کاهش بیشتر کشش بین‌فازی، تشکیل قطرات ریزتر و پایداری را تسهیل نماید (Garti & Aserin, 2015). همچنین، حضور پایدارکننده‌هایی مانند زانتان گام با افزایش ویسکوزیته فاز پیوسته، می‌تواند به بهبود پایداری در برابر جدایش گرانشی کمک کند (Sworn, 2021).

با توجه به مرور پژوهش‌های پیشین، اگرچه مطالعات متعددی در زمینه تولید نانومولسیون اسانس‌های مختلف انجام شده است (Acevedo-Fani et al., 2017; Hashtjin & Abbasi, 2023; Hosseini & Jafari, 2020; Komaiko & McClements, 2023; Gupta & Jaiswal, 2015)، اما در خصوص نانومولسیون خوراکی زعفران، مطالعات بسیار محدودی گزارش شده است. در مطالعه Moradi (2024) و Kousheh (2024) به بررسی ثبت اختراعات مربوط به نانومولسیون‌سازی اولتراسونیک زعفران پرداخته شده، اما مطالعه تجربی جامعی در زمینه بهینه‌سازی شرایط تولید ارائه نشده است. Hashtjin و Abbasi (2023) تولید نانومولسیون اسانس زعفران را با استفاده از اولتراسوند بررسی کرده‌اند، اما در پژوهش آن‌ها اندازه قطرات در محدوده بالای ۵۰ نانومتر گزارش شده و به بررسی همزمان شفافیت و پایداری حسی در بستر نوشیدنی پرداخته نشده است. علاوه بر این، بیشتر مطالعات موجود در زمینه سامانه‌های نانومولسیونی بر روی اسانس‌های مرکبات (Rao & McClements, 2011; Lu et al., 2022) یا روغن‌های گیاهی (Esfanjani & Jafari, 2016) متمرکز بوده و خلأ تحقیقاتی در زمینه نانومولسیون‌سازی اسانس

زعفران به عنوان یک طعم‌دهنده ارزشمند و حساس به وضوح احساس می‌شود. نانوامولسیون توسعه‌یافته در این پژوهش از سه مزیت کلیدی نسبت به سامانه‌های مشابه برخوردار است: (۱) میانگین اندازه قطرات ۱۴.۷ نانومتر که در مقایسه با اکثر نانوامولسیون‌های خوراکی گزارش شده در منابع (معمولاً بالای ۵۰ نانومتر) یک دستاورد قابل توجه محسوب می‌شود، (۲) شفافیت بالا (۹۳.۱٪ عبور نور) که امکان کاربرد در نوشیدنی‌های شفاف را فراهم می‌کند، و (۳) پایداری فیزیکی و حسی استثنایی در برابر تنش‌های محیطی شامل دما، انجماد، pH و قدرت یونی که این سامانه را از بسیاری از نمونه‌های مشابه متمایز می‌سازد. این پژوهش با بهره‌گیری از یک رویکرد سیستماتیک مبتنی بر روش سطح پاسخ (RSM) و بررسی همزمان پنج عامل مؤثر در فرمولاسیون و فرآیند، به دنبال پر کردن این خلأ و ارائه یک سامانه نانوامولسیونی با عملکرد برتر برای کاربرد در صنایع غذایی به ویژه نوشیدنی‌های شفاف است.

اهمیت کاربردی نانوامولسیون توسعه‌یافته در صنعت غذا از چند جنبه حائز اهمیت است. نخست، تبدیل یک اسانس نامحلول در آب به یک سامانه کاملاً محلول و شفاف با پایه آبی، امکان استفاده از آن را در طیف وسیعی از محصولات غذایی از جمله نوشیدنی‌های شفاف (آب‌های طعم‌دار، نوشیدنی‌های انرژی‌زا و شربت‌های زلال) فراهم می‌سازد که شفافیت در آن‌ها یک پارامتر کلیدی کیفی محسوب می‌شود (Tastan & Baysal, 2022). دوم، پایداری فیزیکی و شیمیایی بالای این نانوامولسیون به معنای افزایش چشمگیر طول عمر مفید محصول نهایی و کاهش ضایعات در طول زنجیره تأمین است که از منظر اقتصادی بسیار حائز اهمیت می‌باشد (Kumar et al., 2022). سوم، حفظ پایداری جزء فعال و برتری حسی معنادار نسبت به اسانس غیرامولسیونی، نشان‌دهنده توانایی این سامانه در حفظ یکپارچگی عطر و طعم زعفران در طول فرآوری و نگهداری است که برای تولیدکنندگان مواد غذایی به معنای ارائه محصولی با کیفیت حسی برتر و افزایش رضایت مصرف‌کننده خواهد بود (McClements, 2021). چهارم، با کاهش نیاز به حلال‌های آلی و فیلرهای شیمیایی و استفاده از امولسیفایرهای مجاز خوراکی، می‌توان محصولی با برچسب پاک (Clean Label) ارائه داد که با تقاضای روزافزون مصرف‌کنندگان برای محصولات طبیعی و فرآوری نشده همسو است (Assadpour & Jafari, 2019). این ویژگی‌ها، نانوامولسیون توسعه‌یافته را به گزینه‌ای جذاب برای تولیدکنندگان صنایع غذایی، به‌ویژه در حوزه نوشیدنی‌های شفاف با ارزش افزوده بالا، تبدیل می‌نماید.

بر این اساس، اهداف پژوهش حاضر عبارت بودند از: (۱) شناسایی نوع و غلظت بهینه امولسیفایر و کمک‌امولسیفایر برای تشکیل نانوامولسیون پایدار زعفران، (۲) بهینه‌سازی همزمان پارامترهای فرمولاسیون (غلظت توپین ۸۰، پروپیلن گلیکول و اسانس زعفران) و پارامترهای فرآیندی (توان و زمان اولتراسوند) با استفاده از روش سطح پاسخ، (۳) بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، پایداری و شفافیت نانوامولسیون بهینه، (۴) ارزیابی پایداری نانوامولسیون در برابر تنش‌های محیطی شامل دما، pH، قدرت یونی و انجماد، (۵) مقایسه عملکرد حسی نانوامولسیون با اسانس غیرامولسیونی در حالت خالص و در بستر نوشیدنی، و (۶) تعیین میزان حفظ ترکیب کلیدی سافرانال در نانوامولسیون نهایی.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد اولیه

اسانس پایه زعفران (گرید غذایی، شرکت دنیای عطروطعم دیارا، ایران) به عنوان فاز روغنی استفاده شد. امولسیفایرهای مورد استفاده شامل توپین ۸۰ (پلی‌سوربات ۸۰، گرید غذایی، شرکت مرک، آلمان)، صمغ عربی (گرید غذایی، شرکت سیگما-آلدریج، آلمان)، لسیتین (گرید غذایی، شرکت Lipoid، سوئیس)، پروتئین آب پنیر (گرید غذایی، شرکت Hilmar Ingredients، آمریکا)، نشاسته اصلاح‌شده (Starch-OSA، درجه جایگزینی ۳٪، گرید غذایی، شرکت Ingredion، آمریکا)، Brij35 (پلی‌اکسی‌اتیلن لوریل اتر، گرید تحلیلی، شرکت مرک، آلمان) و اسپان ۲۰ (سوربیتان مونولاترات، گرید غذایی، شرکت مرک، آلمان) از تأمین‌کنندگان معتبر تهیه شدند. کمک‌امولسیفایرهای پروپیلن گلیکول (خلوص ۹۹٪)، گرید غذایی، شرکت مرک، آلمان، گلیسرین (خلوص ۹۹.۵٪)، گرید غذایی، شرکت مرک، آلمان و اتانول (خلوص ۹۶٪)، گرید غذایی، شرکت مرک، آلمان و همچنین پایدارکننده زانتان گام (گرید غذایی، شرکت CP Kelco، آمریکا) مورد استفاده قرار گرفتند. نگهدارنده‌های سدیم بنزوات (خلوص

ک ۹۹٪، مرک، آلمان) و اسید سیتریک (خلوص $\leq 99.5\%$ ، شرکت مرک، آلمان) به ترتیب برای کنترل بار میکروبی و تنظیم pH به کار رفتند. کلیه درصدهای وزنی بر اساس وزن کل فرمولاسیون (۱۰۰ گرم) محاسبه شده و تمامی مواد مصرفی دارای گرید خوراکی بوده و بدون خالص سازی بیشتر مورد استفاده قرار گرفتند. آب دیونیزه (مقاومت ویژه $\leq 18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ ، تهیه شده با دستگاه اسمز معکوس و تبادل یونی) به عنوان فاز پیوسته در تمامی فرمولاسیون ها به کار رفت.

سدیم بنزوات به عنوان نگهدارنده ضد میکروبی در غلظت ۰/۲ گرم (معادل ۰/۲ درصد وزنی) به فاز آبی افزوده شد تا از رشد میکروارگانیسم ها در طی نگهداری نمونه ها جلوگیری شود. اسید سیتریک نیز در غلظت ۰/۳۹ گرم (معادل ۰/۳۹ درصد وزنی) به عنوان تنظیم کننده pH و نیز عامل کمکی در افزایش پایداری امولسیون از طریق ایجاد بار سطحی بر روی قطرات و بهبود کارایی امولسیفایرها به کار رفت. هر دو ماده در غلظت های مورد استفاده در این پژوهش، تأثیر قابل توجهی بر اندازه ذرات یا شفافیت نهایی نانوامولسیون نداشته و نقش آن ها صرفاً حفظ شرایط میکروبی و تنظیم pH محیط بوده است.

۲-۲- تهیه نانوامولسیون ها

برای تهیه نانوامولسیون ها، ابتدا فاز آبی شامل آب دیونیزه، امولسیفایرها (با درصدهای تعیین شده در طراحی آزمایش)، سدیم بنزوات (۰/۲ گرم) و اسید سیتریک (۰/۳۹ گرم) در یک بشر شیشه ای ۱۰۰ میلی لیتری ریخته شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای $25 \pm 5^\circ\text{C}$ درجه سانتی گراد تحت همزدن با همزن مغناطیسی (مدل IKA C-MAG HS7، آلمان) با سرعت ۳۰۰ دور بر دقیقه قرار گرفت تا هیدراتاسیون کامل امولسیفایرها و پایداری کننده ها صورت گیرد. فاز روغنی شامل اسانس زعفران (۳-۵ درصد وزن کل) به همراه توپین ۸۰ (با غلظت های تعیین شده) به طور جداگانه در یک بشر جداگانه تهیه و به مدت ۵ دقیقه با همزن مغناطیسی با سرعت ۲۰۰ دور بر دقیقه همگن شد. سپس فاز روغنی به آرامی و در مدت ۲ دقیقه به فاز آبی در حال همزدن (با سرعت ۵۰۰ دور بر دقیقه) افزوده شد و مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۷۰۰ دور بر دقیقه با همزن مغناطیسی هم زده شد تا پیش مخلوط امولسیونی یکنواختی تشکیل گردد. برای تشکیل نانوامولسیون نهایی، از دستگاه مولد امواج فراصوت (مدل S-400، ساخت شرکت Hielscher، آلمان، با حداکثر توان ۴۰۰ وات و فرکانس ۲۰ کیلوهرتز) استفاده شد. پیش مخلوط (۵۰ میلی لیتر) به ظرف مخصوص اعمال فراصوت (ظرف دو جداره شیشه ای با حجم مفید ۱۰۰ میلی لیتر) منتقل گردید و سونوتروپ تیتانیومی با قطر ۱۹/۱ میلی متر تا عمق ۱ سانتی متری زیر سطح نمونه غوطه ور شد. توان دستگاه در محدوده ۷۰ تا ۱۰۰ درصد (معادل ۲۸۰ تا ۴۰۰ وات) و زمان صوت دهی در محدوده ۹۰ تا ۱۵۰ ثانیه بر اساس طراحی آزمایش تنظیم گردید. به منظور جلوگیری از افزایش دمای ناخواسته (بیش از ۴۰ درجه سانتی گراد) که می تواند به ترکیبات حساس اسانس آسیب برساند، نمونه در طول فرآیند با استفاده از چرخش مداوم سیال خنک کننده (مخلوط آب و ضد یخ با دمای ۴- درجه سانتی گراد) در جداره دوگانه ظرف و نیز توسط یک سیرکولاتور (مدل Lauda RA 8، ساخت آلمان، با دقت کنترل دمای $\pm 0.1^\circ\text{C}$ درجه سانتی گراد) در دمای کنترل شده (حداکثر ۴۰ درجه سانتی گراد) نگهداری شد. دمای نمونه به طور مداوم توسط یک ترموکوپل متصل به دستگاه سیرکولاتور پایش گردید. در پایان هر فرآیند، مقدار انرژی مصرفی (بر حسب کیلوژول) از روی صفحه نمایش دستگاه ثبت گردید. بلافاصله پس از اتمام فرآیند اولتراسوند، نمونه ها در حمام یخ قرار داده شدند تا دمای آن ها به سرعت به دمای محیط (۲۵ درجه سانتی گراد) کاهش یابد. همچنین در برخی نمونه ها (برای مقایسه عملکرد اولتراسوند با روش روتور-استاتور)، از هموژنایزر روتور-استاتور (اولتراتوراکس، مدل T-25، ساخت شرکت IKA، آلمان) با دور ۳ (معادل ۱۶۰۰۰ دور بر دقیقه) به مدت ۱۰-۱۵ دقیقه استفاده شد. کلیه مراحل تهیه نمونه ها در دمای محیط ($15 \pm 25^\circ\text{C}$ درجه سانتی گراد) و در سه تکرار انجام گردید.

۲-۳- تعیین نوع امولسیفایر و کمک امولسیفایر

به منظور شناسایی مناسب ترین امولسیفایر و کمک امولسیفایر برای تولید نانوامولسیون زعفران، طیف گسترده ای از امولسیفایرها شامل توپین ۸۰ (۵ و ۱۰ درصد)، صمغ عربی (۲، ۵ و ۱۰ درصد)، لسیتین (۵ و ۱۰ درصد)، پروتئین آب پنیر (۵ و ۱۰ درصد)، نشاسته اصلاح شده (۵ و ۱۰ درصد)، Brij35 (۵ و ۱۰ درصد)، اسپان ۲۰ (۵ و ۱۰ درصد) و همچنین ترکیبات آن ها (مانند نشاسته اصلاح شده + توپین ۸۰، صمغ عربی + زانتان و صمغ عربی + زانتان + توپین ۸۰) مورد ارزیابی قرار گرفتند. همچنین سه نوع

کمک امولسیفایر شامل پروپیلن گلیکول، گلیسرین و اتانول (در غلظت‌های مختلف) آزمایش شدند. تمامی آزمایش‌های این مرحله با استفاده از ۴ درصد اسانس زعفران و شرایط یکسان دستگاه اولتراسوند (توان ۹۰٪ معادل ۳۶۰ وات، زمان ۲ دقیقه) انجام شد تا تنها تأثیر نوع امولسیفایر و کمک امولسیفایر بر پایداری و حالت اولیه امولسیون بررسی گردد. معیارهای ارزیابی شامل حالت فیزیکی (تک فاز یا دو فاز)، درصد عبور نور (شفافیت) و درصد پایداری پس از سانتریفیوژ بودند.

۲-۴- طراحی آزمایش و بهینه‌سازی با روش سطح پاسخ

به منظور بهینه‌سازی همزمان پارامترهای فرمولاسیون و فرآیند، از روش سطح پاسخ (Response Surface Methodology) با طرح مرکب مرکزی (Central Composite Design) با ۵ عامل، ۴ پاسخ و ضریب $\alpha = 2$ (طرح مرکب مرکزی چرخش‌پذیر) استفاده شد. پنج عامل مستقل شامل (A) غلظت تویین ۸۰ (۱-۲۰ درصد)، (B) غلظت پروپیلن گلیکول (۵-۱۰ درصد)، (C) غلظت اسانس زعفران (۳-۵ درصد)، (D) توان دستگاه اولتراسوند (۲۸۰-۴۰۰ وات) و (E) زمان صوت‌دهی (۹۰-۱۵۰ ثانیه) به عنوان متغیرهای ورودی در نظر گرفته شدند. چهار پاسخ (متغیر خروجی) شامل اندازه ذرات (نانومتر)، پتانسیل زتا (میلی‌ولت)، درصد عبور نور در طول موج ۶۰۰ نانومتر (معیار شفافیت) و درصد پایداری اولیه (پس از سانتریفیوژ) مورد ارزیابی قرار گرفتند. تعداد کل آزمایش‌های طراحی شده شامل ۴۵ آزمایش بود که عبارت بودند از: ۳۲ آزمایش فاکتوریل (شامل ۱۶ نقطه مکعبی، ۱۰ نقطه محوری و ۶ تکرار در نقطه مرکزی) و ۱۳ آزمایش اضافی برای برآورد دقیق‌تر ضرایب مدل. به منظور اطمینان از دقت و تکرارپذیری، تمامی آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد و نتایج به صورت میانگین گزارش گردید. داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار Design Expert (نسخه ۱۳، شرکت Stat-Ease Inc، آمریکا) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. مدل‌های درجه دوم (Quadratic) برای هر پاسخ برازش داده شدند و آنالیز واریانس (ANOVA) برای تعیین معناداری مدل‌ها و ضرایب در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($p\text{-value} < 0.05$) انجام گرفت. برای ارزیابی کفایت مدل‌ها، معیارهای آماری شامل ضریب تعیین (R^2)، ضریب تعیین تعدیل‌یافته ($R^2\text{-adjusted}$)، ضریب تعیین پیش‌بینی‌شده ($R^2\text{-predicted}$) و عدم معناداری ($p\text{-value}$) مربوط به آزمون عدم برازش (Lack of Fit) مورد بررسی قرار گرفتند. مدل‌های درجه دوم که شرایط فوق را تأیید کردند، برای پیش‌بینی رفتار سیستم و تعیین شرایط بهینه انتخاب شدند. در نهایت، شرایط بهینه با استفاده از تابع مطلوبیت (Desirability Function) با هدف بیشینه‌سازی شفافیت و پایداری، کمینه‌سازی اندازه ذرات و دستیابی به پتانسیل زتای مطلوب (با قدر مطلق ≤ 30 میلی‌ولت) تعیین گردید. برای اعتبارسنجی مدل، نقطه بهینه پیش‌بینی‌شده به صورت تجربی در سه تکرار تهیه و مقادیر پاسخ‌ها با مقادیر پیش‌بینی‌شده توسط مدل مقایسه گردید و خطای نسبی کمتر از ۵ درصد به عنوان معیار تأیید مدل در نظر گرفته شد.

۲-۵- اندازه‌گیری اندازه ذرات و پتانسیل زتا

میانگین اندازه هیدرودینامیکی قطرات نانوامولسیون و شاخص پراکندگی (PDI) با استفاده از دستگاه تفرق نور دینامیکی (Dynamic Light Scattering, DLS) (مدل Nano-ZS ZEN 3600، ساخت شرکت Malvern Instruments، انگلستان) مجهز به لیزر He-Ne با طول موج ۶۳۲.۸ نانومتر اندازه‌گیری شد. نمونه‌ها قبل از اندازه‌گیری با آب دیونیزه (مقاومت ویژه $\geq 18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$) به نسبت ۱:۱۰۰ (حجمی/حجمی) رقیق شدند تا از اثرات پراکندگی چندگانه جلوگیری گردد. کلیه اندازه‌گیری‌ها در دمای 25 ± 1.0 درجه سانتی‌گراد (با استفاده از سیستم کنترل دمای داخلی دستگاه) و در pH طبیعی نمونه (حدود ۶.۵-۷) انجام شد. زاویه پراکندگی ۱۷۳ درجه (زاویه برگشتی) برای اندازه‌گیری انتخاب شد و هر نمونه حداقل ۳ بار (هر بار شامل ۱۰ سابران) اندازه‌گیری شد. نتایج به صورت میانگین اندازه ذرات (Z-average) و شاخص پراکندگی (PDI) گزارش گردید. پتانسیل زتا (Zeta potential) نیز با استفاده از دستگاه مذکور و بر اساس روش الکتروفورز لیزری (تکنیک پراکندگی نور الکتروفورتیک) در همان دما (25 ± 1.0 درجه سانتی‌گراد)، همان رقت و در pH طبیعی نمونه اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری پتانسیل زتا، نمونه‌ها در سلول‌های مخصوص پتانسیل زتا (سلول پلی‌استایرن با الکترودهای طلا) قرار داده شدند و ولتاژ اعمال شده ۱۵۰ ولت در نظر گرفته شد. هر اندازه‌گیری پتانسیل زتا حداقل در سه تکرار انجام گرفت و نتایج به صورت میانگین گزارش گردید. پیش از هر سری

اندازه‌گیری، دستگاه با استفاده از استاندارد لاتکس پلی‌استایرن با اندازه ۲۰۰ نانومتر (برای DLS) و استاندارد زتا پتانسیل -۵۰ میلی‌ولت (برای پتانسیل زتا) کالیبره شد.

۲-۶- اندازه‌گیری شفافیت (درصد عبور نور)

برای ارزیابی کمی شفافیت نانوامولسیون‌ها، از دستگاه طیف‌سنج نوری UV-Vis (مدل UV-2600، ساخت شرکت Shimadzu، ژاپن) مجهز به دو پرتو و سیستم کنترل دما استفاده شد. طول موج اندازه‌گیری ۶۰۰ نانومتر انتخاب گردید که منطبق با ناحیه مرئی بوده و خارج از محدوده جذب ترکیبات رنگی زعفران (کروسین با حداکثر جذب در حدود ۴۴۰ نانومتر) و سافرانال می‌باشد. دستگاه ابتدا با آب دیونیزه (به عنوان بلانک) در دو وضعیت کالیبره شد: (۱) خط پایه (Baseline) با هر دو کووت حاوی آب دیونیزه و (۲) صفر کردن (Zero) با کووت مرجع حاوی آب دیونیزه. نمونه‌های رقیق‌نشده مستقیماً در کووت‌های یکبار مصرف (با طول مسیر نوری ۱ سانتی‌متر) ریخته شده و درصد عبور نور (%T, Transmittance) در طول موج ۶۰۰ نانومتر قرائت شد. پس از قرار دادن کووت حاوی نمونه در دستگاه، مقدار عبور نور بر اساس رابطه $(100 \times (I/I_0))$ محاسبه گردید که در آن I شدت نور عبوری از نمونه و I_0 شدت نور عبوری از بلانک (آب دیونیزه) می‌باشد. برای هر نمونه، اندازه‌گیری در سه تکرار مجزا انجام شد و نتایج به صورت میانگین گزارش گردید.

۲-۷- سنجش پایداری فیزیکی (آزمون سانتریفیوژ)

پایداری فیزیکی اولیه نانوامولسیون‌ها با استفاده از آزمون سانتریفیوژ شتاب‌یافته انجام شد. بدین منظور، نمونه‌ها (به حجم ۱۰ میلی‌لیتر) در لوله‌های سانتریفیوژ ۱۵ میلی‌لیتری قرار داده شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ rpm (معادل نیروی گریز از مرکز حدود $12000 \times g$) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد تحت سانتریفیوژ (دستگاه سانتریفیوژ مدل R5810، ساخت شرکت Eppendorf، آلمان) قرار گرفتند. پس از اتمام سانتریفیوژ، نمونه‌ها به آرامی از دستگاه خارج شده و از نظر جدایش فازی به دو صورت بررسی شدند: (۱) مشاهده چشمی برای تشخیص هرگونه جدایش فازی آشکار (تشکیل لایه روغنی در سطح فوقانی یا رسوب در کف لوله) و (۲) اندازه‌گیری حجم فازهای جدا شده با استفاده از خطوط درجه‌بندی روی لوله‌های سانتریفیوژ. درصد پایداری بر اساس نسبت حجم فاز امولسیون باقی‌مانده (فاز یکنواخت) به حجم کل نمونه، مطابق رابطه زیر محاسبه گردید:

$$\text{پایداری درصد} = \left(1 - \frac{V_{\text{جدا شده}}}{V_{\text{کل}}}\right) \times 100$$

که در آن $V_{\text{جدا شده}}$ حجم کل فازهای جدا شده (شامل فاز روغنی جدا شده در سطح و فاز آبی شفاف در کف در صورت وجود) و $V_{\text{کل}}$ حجم کل نمونه (۱۰ میلی‌لیتر) می‌باشد. نمونه‌هایی که درصد پایداری $\leq 90\%$ نشان می‌دادند، به عنوان نمونه‌های پایدار از نظر فیزیکی در برابر تنش مکانیکی سانتریفیوژ در نظر گرفته شدند و نمونه‌هایی با پایداری کمتر از ۹۰٪ به عنوان نمونه‌های ناپایدار تلقی گردیدند که نیاز به اصلاح فرمولاسیون یا فرآیند داشتند. کلیه آزمایش‌های پایداری در سه تکرار انجام شد و نتایج به صورت میانگین گزارش گردید.

۲-۸- آنالیز ترکیبات شیمیایی (GC-MS)

به منظور تعیین درصد سافرانال به عنوان مهم‌ترین ترکیب معطر اسانس زعفران، از دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی (GC-MS) (مدل QP-2010 Ultra، ساخت شرکت Shimadzu، ژاپن) مجهز به ستون کروماتوگرافی Rtx-5MS (با طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت فاز ساکن ۰/۲۵ میکرومتر، فاز ساکن: ۵٪ فنیل-۹۵٪ دی‌متیل پلی‌سیلوکسان) استفاده شد. گاز حامل هلیوم (خلوص ۹۹.۹۹۹٪) با دبی ثابت ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه به کار رفت. حجم تزریق ۰/۵ میکرولیتر در نظر گرفته شد.

برای آماده‌سازی نمونه، مقدار ۴۰ میکرولیتر از نمونه نانوامولسیونی به همراه ۱ میلی‌لیتر استونیتریل (درجه خلوص ۹۹.۹٪، شرکت Merck، آلمان) مخلوط و به مدت ۲ دقیقه در هموژنایزر ورتکس (با سرعت ۳۰۰۰ دور بر دقیقه) هم‌زده شد تا استخراج کامل ترکیبات فرار انجام گیرد. سپس محلول حاصل از صافی ۰/۴۵ میکرون عبور داده شده و به ویال مخصوص تزریق GC-MS منتقل

گردید. شناسایی ترکیبات بر اساس مقایسه زمان بازداری و طیف جرمی با استاندارد سافرانال (خلوص $\leq 98\%$ ، شرکت-Sigma Aldrich، آمریکا) و کتابخانه طیفی NIST (نسخه ۲۰۱۷) انجام گرفت. درصد نسبی سافرانال با استفاده از روش نرمال سازی سطح زیر پیک (Normalization Area Method) بر اساس رابطه زیر محاسبه شد:

$$= \left(\frac{\text{سافرانال پیک زیر مساحت}}{\text{کروماتوگرام در شده شناسایی های پیک تمام مساحت مجموع}} \right) \times 100 = \text{سافرانال درصد}$$

۹-۲- ارزیابی پایداری در برابر تنش های محیطی

۹-۲-۱- پایداری حرارتی شتاب یافته

به منظور ارزیابی پایداری نانوامولسیون در برابر دماهای بالا، نمونه بهینه به مدت ۴ هفته در آون با دمای ثابت ۴۵ درجه سانتی گراد نگهداری شد. در فواصل زمانی هفتگی، نمونه ها از نظر تغییرات ظاهری (جدایش فاز، کدورت، تغییر رنگ) و شفافیت (درصد عبور نور در ۶۰۰ نانومتر) مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین آزمون پاستوریزاسیون با قرار دادن نمونه ها در حمام آب گرم در دمای ۷۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد.

۹-۲-۲- پایداری در برابر انجماد

برای بررسی تأثیر انجماد بر پایداری نانوامولسیون، نمونه بهینه به مدت ۲۴ ساعت در فریزر با دمای ۱۸- درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس نمونه خارج شده و در دمای محیط قرار گرفت تا به طور کامل ذوب شود. وضعیت ظاهری نمونه از نظر یکنواختی، عدم جدایش فاز و برگشت پذیری به حالت اولیه بلافاصله پس از ذوب و رسیدن به دمای محیط بررسی گردید.

۹-۲-۳- پایداری در برابر pH

تأثیر pH بر پایداری نانوامولسیون با تنظیم pH نمونه بهینه به دو مقدار ۲ (محیط اسیدی) و ۹ (محیط قلیایی) با استفاده از اسید کلریدریک (HCl) ۰.۵ مولار و سدیم هیدروکسید (NaOH) ۰.۵ مولار انجام شد. پس از تنظیم pH، نمونه ها به مدت ۳۰ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری شدند و وضعیت ظاهری و شفافیت آن ها در پایان دوره بررسی گردید.

۹-۲-۴- پایداری در برابر قدرت یونی

برای ارزیابی تأثیر الکترولیت ها بر پایداری نانوامولسیون، محلول کلرید سدیم (NaCl) با غلظت ۲۰۰ میلی مولار تهیه شد و به عنوان فاز آبی در تهیه نانوامولسیون (مطابق روش بخش ۲-۲) مورد استفاده قرار گرفت. نمونه تهیه شده به مدت ۳۰ روز در دمای محیط نگهداری شد و وضعیت ظاهری، شفافیت و پایداری فیزیکی آن در پایان دوره بررسی گردید.

۱۰-۲- ارزیابی حسی

ارزیابی حسی نانوامولسیون بهینه در مقایسه با اسانس غیرامولسیون (نمونه شاهد) در دو حالت انجام شد: (۱) ارزیابی مستقیم در رقت ۰/۰۳ درصد در آب و (۲) ارزیابی در بستر نوشیدنی. پایه نوشیدنی شامل شکر (۹/۴ درصد)، صمغ عربی (۰/۰۷ درصد)، اسید سیتریک (۰/۰۲۶ درصد)، گلاب (۲۵ درصد) و بتاکاروتن (۰/۰۰۶ درصد) بود که آب تا ۱۰۰ درصد به آن افزوده شد. سپس ۰/۱ درصد از نانوامولسیون (یا اسانس غیرامولسیون) به پایه نوشیدنی اضافه و به مدت ۲ دقیقه با همزن مغناطیسی با سرعت ۳۰۰ دور بر دقیقه هم زده شد تا توزیع یکنواخت حاصل گردد. ارزیابی حسی توسط ۲۰ داور آموزش دیده (شامل ۱۰ مرد و ۱۰ زن) در محدوده سنی ۲۵ تا ۵۰ سال (میانگین سنی ۳۵.۲ سال) انجام شد. کلیه داوران از بین کارکنان شرکت دنیای عطروطعم دیارا انتخاب شدند که دارای تجربه کافی در ارزیابی حسی محصولات غذایی بودند و چندین جلسه آموزشی (شامل آشنایی با روش کار، معیارهای ارزیابی و نحوه استفاده از مقیاس هدونیک) را پیش از آزمون اصلی گذرانده بودند. از داوران خواسته شد تا ۲ ساعت قبل از آزمون از مصرف مواد غذایی با طعم قوی (مانند قهوه، چای پررنگ یا غذای تند) خودداری کنند. ارزیابی با استفاده از روش هدونیک (Hedonic Scale) ۵ نقطه ای (۱: کاملاً نامطلوب، ۲: نسبتاً نامطلوب، ۳: نه نامطلوب و نه مطلوب، ۴: نسبتاً مطلوب، ۵: کاملاً مطلوب) انجام گرفت. داوران سه شاخص مطلوبیت بو، مطلوبیت طعم و مطلوبیت کلی را برای هر نمونه امتیازدهی کردند.

نمونه‌ها در ظروف یکسان (لیوان‌های یکبار مصرف سفید با حجم ۵۰ میلی‌لیتر) و با کدگذاری سه رقمی تصادفی به داوران ارائه شدند و ترتیب ارائه نمونه‌ها بین داوران به صورت تصادفی (طرح بلوک‌های کامل تصادفی) در نظر گرفته شد. فاصله زمانی بین ارائه هر نمونه ۳ دقیقه در نظر گرفته شد و از داوران خواسته شد بین هر نمونه، دهان خود را با آب آشامیدنی معمولی بشویند تا از اثرات باقی‌مانده طعم جلوگیری شود. کلیه ارزیابی‌ها در دمای محیط (1 ± 25 درجه سانتی‌گراد) و در شرایط نوری یکسان (نور سفید) در یک اتاقک مجهز به کابین‌های انفرادی انجام گرفت. این مطالعه با اصول اخلاقی در پژوهش‌های غذایی مطابقت داشته و کلیه داوران قبل از شروع آزمون، رضایت آگاهانه کتبی برای مشارکت در مطالعه ارائه داده‌اند. نتایج به صورت میانگین گزارش گردید و از آزمون آماری t-test جفتی (Paired t-test) برای مقایسه میانگین امتیازات نمونه امولسیون و غیرامولسیونی در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($p\text{-value} < 0.05$) استفاده شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- تعیین نوع امولسیفایر و کمک‌امولسیفایر

انتخاب امولسیفایر مناسب نقشی حیاتی در تعیین ویژگی‌های نهایی یک سامانه کلوئیدی از جمله اندازه ذرات، پایداری فیزیکی و شفافیت ظاهری دارد. این انتخاب به شدت تحت تأثیر طبیعت شیمیایی فاز پراکنده (اسانس زعفران با ماهیت لیپوفیل) و فاز پیوسته (آب) قرار می‌گیرد. سازوکار اصلی امولسیفایرها، کاهش انرژی آزاد سطحی در فصل مشترک روغن و آب از طریق جذب در این ناحیه و ایجاد سد فیزیکی یا الکترواستاتیکی در برابر نزدیک شدن و ادغام قطرات است. بر این اساس، در این پژوهش طیف گسترده‌ای از امولسیفایرها با مکانیسم‌های عمل متفاوت مورد بررسی قرار گرفتند. سورفکتانت‌های سنتزی غیر یونی مانند تویین ۸۰ (پلی‌سوربات ۸۰) به عنوان پرکاربردترین امولسیفایر در صنایع غذایی شناخته می‌شوند. مقدار HLB این ترکیب در محدوده ۱۵ قرار دارد که آن را برای تشکیل امولسیون‌های روغن در آب ایده‌آل می‌سازد. ساختار مولکولی تویین ۸۰ شامل یک بخش هیدروفوبیک حلقوی حاصل از اسید اولئیک و یک زنجیره هیدروفیلک طولانی از پلی‌اتیلن گلیکول است. این ساختار دوگانه‌افزار به مولکول اجازه می‌دهد به طور مؤثری در فصل مشترک جذب شده و با کاهش شدید کشش بین‌سطحی، تشکیل قطرات ریز در حین فرآیند هموژنیزاسیون را تسهیل کند. پایداری قطرات عمده‌تاً از طریق ایجاد سد استریک ناشی از زنجیره‌های هیدروفیلک گسترده تأمین می‌شود که از نزدیک شدن قطرات به یکدیگر جلوگیری می‌کند. در مقابل، امولسیفایرهای طبیعی مبتنی بر پلی‌ساکارید مانند صمغ عربی (آکاسیا) مکانیسم عمل متفاوتی دارند. این ترکیب، یک پلی‌ساکارید پیچیده با وزن مولکولی بالا و دارای درصد کمی از پروتئین متصل است که خواص سطح‌فعالی خفیف به آن می‌بخشد. عملکرد اصلی صمغ عربی، جذب در سطح قطرات و تشکیل یک لایه ضخیم و ویسکوز است که پایداری را عمده‌تاً از طریق مکانیسم استریک و افزایش ویسکوزیته فاز پیوسته فراهم می‌کند. با این حال، به دلیل اندازه بزرگ مولکولی و فعالیت سطحی نسبتاً پایین، اغلب برای دستیابی به پوشش کامل سطحی به غلظت‌های بالاتری نیاز است و قطرات تشکیل‌شده تمایل به درشت‌تر بودن دارند که می‌تواند منجر به کاهش شفافیت شود. امولسیفایرهای پروتئینی مانند پروتئین آب پنیر نیز در سطح قطرات جذب شده و با دناتوره شدن جزئی، لایه ای انعطاف‌ناپذیر ایجاد می‌کنند که پایداری را از طریق ممانعت استریک و الکترواستاتیک تأمین می‌نماید. با این حال، عملکرد آن‌ها به شدت تحت تأثیر شرایط محیطی مانند pH، قدرت یونی و دما قرار دارد. نشاسته‌های اصلاح‌شده مانند استارچ-OSA با معرفی گروه‌های هیدروفوبیک آلکیل سوکسینیل به ساختار نشاسته، خواص امولسیون‌کنندگی کسب می‌کنند. بخش هیدروفوب به داخل فاز روغن نفوذ کرده و بخش هیدروفیل پلی‌ساکاریدی در فاز آبی باقی می‌ماند و پایداری استریک ایجاد می‌کند. در این میان، نقش کمک‌امولسیفایرها یا کمک‌حلال‌ها نیز غیرقابل اغماض است. ترکیباتی مانند پروپیلن گلیکول، که یک الکل دی‌هیدریک با قطبیت بالا است، به عنوان کمک‌حلال عمل می‌کنند. پروپیلن گلیکول با افزایش انحلال‌پذیری اجزای لیپوفیلک (اسانس و بخش هیدروفوب امولسیفایر) در فاز آبی، به طور مؤثری کشش بین‌فازی را کاهش می‌دهد. این امر نه تنها فرآیند شکستن قطرات در حین هموژنیزاسیون اولتراسونیک را تسهیل می‌کند، بلکه می‌تواند منجر به تشکیل سیستم‌های مایسلی معکوس یا میکروامولسیون‌های شفاف در حین آماده‌سازی پیش‌مخلوط گردد.

به منظور بررسی تجربی این مبانی نظری، تمام آزمایش‌های مرحله اول با استفاده از ۴ درصد اسانس زعفران و شرایط یکسان دستگاه اولتراسوند (توان ۹۰٪، معادل ۳۶۰ وات، زمان ۲ دقیقه) انجام شد تا تنها تأثیر نوع امولسیفایر و کمک‌امولسیفایر بر پایداری و حالت اولیه امولسیون بررسی گردد. نتایج این آزمایش‌ها در جدول ۱ ارائه شده است. با بررسی نتایج جدول ۱، تأثیر چشمگیر نوع و ترکیب امولسیفایر و کمک‌امولسیفایر بر ویژگی‌های کلیدی نانوامولسیون اسانس زعفران به وضوح قابل مشاهده است. در میان تمامی فرمولاسیون‌های مورد آزمایش، نمونه‌های شماره ۱، ۲ و ۳ که مبتنی بر امولسیفایر توپین ۸۰ بودند، به طور قابل توجهی برتر ظاهر شدند. نمونه شماره ۱ با ۱۰ درصد توپین ۸۰ و فاقد کمک‌حلال، امولسیون تک‌فاز با شفافیت بسیار بالا (۹۱.۲٪ عبور نور) و پایداری فازی عالی (۹۶٪) پس از سانتریفیوژ تشکیل داد. این نتیجه، مؤید کارایی بالای این سورفکتانت سنتزی با HLB بالا در کاهش کشش سطحی و تشکیل قطرات ریز و پایدار است. افزودن کمک‌حلال‌ها به فرمولاسیون توپین ۸۰، آثار متمایزی داشت. نمونه شماره ۲ که حاوی ۲ درصد پروپیلن گلیکول (PG) بود، به بالاترین میزان شفافیت (۹۳.۳٪) و پایداری (۹۸٪) در بین تمام آزمایش‌ها دست یافت. این امر نقش سینرژیستی پروپیلن گلیکول را به عنوان یک کمک‌حلال قطبی نشان می‌دهد که با افزایش انحلال‌پذیری اجزا در فاز آبی، تشکیل سیستم کلوئیدی ریزتر و یکنواخت‌تر را تسهیل می‌کند. در مقابل، افزودن گلیسرین به نمونه شماره ۳ اگرچه پایداری خوبی (۹۷٪) ایجاد کرد، اما شفافیت نهایی (۹۱.۸٪) کمی پایین‌تر از نمونه حاوی PG بود که احتمالاً ناشی از ویسکوزیته بالاتر و تأثیر متفاوت آن بر توزیع اندازه ذرات است. در مقایسه با عملکرد برجسته توپین ۸۰، امولسیفایرهای طبیعی نتایج ضعیف‌تری را نشان دادند. نمونه‌های مبتنی بر صمغ عربی (ردیف‌های ۴، ۵ و ۶) اگرچه قادر به تشکیل امولسیون تک‌فاز بودند، اما شفافیت آن‌ها به شدت پایین (بین ۷.۵٪ تا ۱۲٪) و پایداری فازی آن‌ها پس از سانتریفیوژ ناچیز (۱۴٪ تا ۲۶٪) بود. این یافته کاملاً با ماهیت این پلی‌ساکارید همسوست که عمدتاً به عنوان تثبیت‌کننده و غلیظ‌کننده عمل می‌کند و فاقد فعالیت سطحی کافی برای تولید قطرات در حد نانومتر و ایجاد شفافیت است. ترکیب صمغ عربی با توپین ۸۰ (ردیف ۶) نیز بهبود محسوسی ایجاد نکرد که نشان می‌دهد حضور صمغ عربی حتی می‌تواند در کارایی توپین ۸۰ اختلال ایجاد کند. نمونه‌های حاوی لسیتین (ردیف‌های ۷ و ۸)، پروتئین آب پنیر (ردیف ۹) و نشاسته OSA (ردیف‌های ۱۰ تا ۱۳) به‌طور کامل در تشکیل امولسیون ناموفق بودند و سیستم دوفاز ایجاد کردند. این شکست می‌تواند ناشی از عدم تطابق HLB این مواد با سیستم روغن در آب مورد نظر، غلظت ناکافی برای پوشش سطحی کامل، یا حساسیت به شرایط فرآیند (مانند برشی شدن بالا در اولتراسوند) باشد. به‌ویژه، شکست ترکیبات نشاسته OSA حتی در حضور مقادیر کمی توپین ۸۰ (ردیف‌های ۱۲ و ۱۳) قابل توجه است. امولسیفایرهای سنتزی دیگر مانند Brij 35 نیز در تمامی غلظت‌های آزمایش شده (ردیف‌های ۱۴ تا ۱۷) قادر به تشکیل امولسیون پایدار نبودند. این موضوع نشان می‌دهد که علی‌رغم شباهت در گروه‌بندی شیمیایی، همه سورفکتانت‌های غیر یونی رفتار یکسانی ندارند و انتخاب دقیق بر اساس سازگاری با سیستم خاص ضروری است. در بخش دیگری از آزمایش‌ها، تأثیر افزایش چشمگیر کمک‌حلال با کاهش غلظت امولسیفایر بررسی شد (ردیف‌های ۱۸ تا ۲۰). در این نمونه‌ها، با وجود استفاده از مقدار کم توپین ۸۰ (۱ گرم) اما حجم بالای کمک‌حلال (۹ گرم)، امولسیون تک‌فاز تشکیل شد، اما شفافیت (۱۱٪ تا ۱۴٪) و پایداری (۴۸٪ تا ۵۴٪) به مراتب پایین‌تر از حالتی بود که توپین ۸۰ عامل غالب بود. این نتایج حاکی از آن است که کمک‌حلال به تنهایی نمی‌تواند جایگزین عملکرد یک امولسیفایر مؤثر شود و نقش آن عمدتاً تسهیل‌گری و تکمیل‌کنندگی است. ترکیب صمغ عربی و زانتان به عنوان یک سیستم تثبیت‌کننده (ردیف‌های ۲۱، ۲۲، ۲۵ و ۲۶) منجر به تشکیل امولسیون‌های تک‌فاز ولی بسیار ویسکوز با شفافیت اندک (۷٪ تا ۱۰٪) و پایداری ضعیف (۱۴٪ تا ۲۰٪) گردید. افزودن مقدار ناچیز توپین ۸۰ به این سیستم (ردیف‌های ۲۵ و ۲۶) نیز بهبود معناداری ایجاد نکرد. این مشاهدات مجدداً بر عدم کفایت پلی‌ساکاریدها برای دستیابی به اهداف این پژوهش تأکید دارد. نهایتاً، آزمایش با امولسیفایر اسپان ۲۰ با HLB پایین‌تر (ردیف‌های ۲۷ و ۲۸)، حتی در حضور مقدار زیاد پروپیلن گلیکول، تنها به شفافیت نسبی (۲۱٪ و ۲۹٪) و پایداری متوسط (۳۵٪ و ۴۶٪) منجر شد که آن را به گزینه‌ای نامناسب برای سیستم امولسیون روغن در آب مورد نظر تبدیل می‌کند.

مشاهدات تصویری ارائه شده در شکل ۱، یافته‌های حاصل از جدول نتایج را به صورت عینی تأیید و تکمیل می‌کند. در این تصویر، نمونه شماره ۱ مربوط به توپین ۸۰ به تنهایی، به صورت یک مایع همگن، شفاف و فاقد هرگونه جدایش فازی قابل مشاهده است. این شفافیت بالا که ناشی از تشکیل قطرات در ابعاد نانومتر می‌باشد، به طور مستقیم با عدد بالای درصد عبور نور (۹۱.۲٪) در جدول مطابقت دارد. در مقابل، نمونه‌های شماره ۲ (مخلوط صمغ عربی و توپین ۸۰) و شماره ۳ (صمغ عربی به تنهایی)، اگرچه ظاهری یکنواخت دارند، اما به وضوح از شفافیت کمتری برخوردارند و کدورت محسوسی در آن‌ها دیده می‌شود. این کدورت بصری کاملاً با مقادیر بسیار پایین عبور نور (به ترتیب ۱۲٪ و ۷.۵٪) در این نمونه‌ها همخوانی دارد و نشانی از تشکیل قطرات درشت‌تر یا وجود ساختارهای پلی‌ساکاریدی پراکنده‌کننده نور است. نمونه شماره ۴ که حاوی ترکیب صمغ عربی و زانتان است، نه تنها کدورت زیادی دارد، بلکه به دلیل افزایش شدید ویسکوزیته، ظاهری ژل‌مانند یا غلیظ‌تر را نشان می‌دهد که با عنوان "تک فاز ویسکوز" در جدول توصیف شده است. از سوی دیگر، تصاویر نمونه‌های شماره ۵ تا ۸ (به ترتیب مربوط به لسیتین، پروتئین آب پنیر، Brij 35 و نشاسته OSA) وضعیت بحرانی و نامطلوبی را نمایش می‌دهند. در این نمونه‌ها جدایش فازی کاملاً مشهود است، به طوری که فاز روغنی اسانس زعفران به صورت لایه ای مجزا در بالا یا پایین ظرف از فاز آبی جدا شده است. این مشاهدات تصویری به طور کامل شکست این امولسیفایرها در تشکیل یک امولسیون پایدار را تأیید می‌کند. این همبستگی قوی بین داده‌های کمی جدول و مشاهدات کیفی تصاویر، صحت روش آزمایش و قابلیت اطمینان نتایج را به خوبی نشان می‌دهد. به طور ویژه، مقایسه بصری نمونه شفاف و یکنواخت توپین ۸۰ با نمونه‌های کدر یا دوفاز دیگر، دلیل محکم و ملموسی برای انتخاب این امولسیفایر به عنوان گزینه برتر ارائه می‌نماید. جمع‌بندی کلی این مرحله از آزمایش‌ها به وضوح نشان می‌دهد که ترکیب توپین ۸۰ و پروپیلن گلیکول (نمونه شماره ۲) به عنوان کارآمدترین سیستم امولسیون‌ساز برای اسانس زعفران شناخته می‌شود. این ترکیب با ایجاد بالاترین سطح شفافیت و پایداری، مبنای علمی مستحکمی برای انتخاب این فرمولاسیون به عنوان پایه مراحل بعدی بهینه‌سازی و طراحی آزمایش ارائه می‌دهد. عملکرد ضعیف امولسیفایرهای طبیعی در این شرایط خاص، لزوم اتکا بر سورفکتانت‌های سنتزی با کارایی بالا را برای دستیابی به نانوامولسیون شفاف مورد نظر توجیه می‌نماید.

برتری ترکیب توپین ۸۰ و پروپیلن گلیکول نسبت به سایر امولسیفایرهای مورد بررسی را می‌توان به سه عامل اصلی نسبت داد: ۱- مقدار HLB توپین ۸۰ (حدود ۱۵) که در محدوده مطلوب برای تشکیل امولسیون روغن در آب قرار دارد و باعث جذب سریع این سورفکتانت در سطح مشترک روغن-آب و کاهش مؤثر کشش سطحی می‌شود. ۲- ساختار مولکولی توپین ۸۰ شامل یک زنجیره هیدروفیلیک طولانی از پلی‌اتیلن گلیکول که سد استریک قوی‌تری در برابر نزدیک شدن قطرات ایجاد می‌کند و ۳- نقش پروپیلن گلیکول به عنوان یک کمک‌حلال قطبی که با کاهش ویسکوزیته فاز روغنی و افزایش انحلال‌پذیری متقابل فازها، فرآیند ریزش قطرات را تسهیل می‌کند. این یافته با نتایج Rao و McClements (2012) که نشان دادند ترکیب سورفکتانت‌های غیر یونی با HLB بالا با کمک‌حلال‌های قطبی می‌تواند منجر به تشکیل سیستم‌های کلوئیدی با اندازه ذرات زیر ۵۰ نانومتر شود، همخوانی کامل دارد.

۳-۲- بهینه‌سازی با روش سطح پاسخ (RSM)

پس از شناسایی ترکیب بهینه امولسیفایر، از روش سطح پاسخ با طرح مرکب مرکزی برای بهینه‌سازی همزمان پنج عامل مستقل شامل غلظت توپین ۸۰ (۱-۲۰٪)، غلظت PG (۵-۱۰٪)، غلظت اسانس (۳-۵٪)، توان اولتراسوند (۲۸۰-۴۰۰ وات) و زمان صوت‌دهی (۹۰-۱۵۰ ثانیه) استفاده شد. دو پاسخ مورد بررسی شامل درصد عبور نور (شفافیت) و درصد پایداری اولیه (پس از سانتریفیوژ) بودند. نتایج آنالیز واریانس (ANOVA) نشان داد که مدل درجه دوم برای هر دو پاسخ معنادار است ($p\text{-value} < 0.0001$). ضریب تعیین (R^2) برای شفافیت و پایداری اولیه به ترتیب ۰.۹۹۷۷ و ۰.۹۳۶۷ بود که نشان‌دهنده برازش عالی مدل‌هاست. عدم معناداری Lack of Fit برای هر دو پاسخ (به ترتیب $p\text{-value} = 0.4468$ و $p\text{-value} = 0.0754$) کفایت مدل‌ها را تأیید کرد.

۳-۲-۱- تأثیر بر شفافیت (درصد عبور نور)

غلظت توپین ۸۰ قوی‌ترین اثر را بر افزایش شفافیت داشت. ($F\text{-value} = 15577.25, p < 0.0001$) با افزایش غلظت توپین ۸۰ از ۱٪ به ۲۰٪، شفافیت از کمتر از ۱۰٪ به بیش از ۹۵٪ افزایش یافت. این پدیده ارتباط مستقیم با کاهش اندازه ذرات دارد، زیرا ذرات کوچک‌تر از ۱۰۰ نانومتر پراکندگی نور کمتری ایجاد می‌کنند. غلظت پروپیلن گلیکول نیز اثر مثبت و تعاملی با توپین ۸۰ نشان داد، به طوری که در غلظت‌های بالای توپین ۸۰، افزایش PG از ۵٪ به ۱۰٪ منجر به افزایش بیشتر شفافیت (از ۹۰.۳٪ به ۹۵.۶٪) گردید. این هم‌افزایی ناشی از نقش PG در کاهش بیشتر کشش بین‌سطحی و هم‌خوانی شاخص انکسار فازها است (شکل ۲). این مشاهده با نتایج Li و Chiang (2012) که بر روی نانومولسیون لیمون به افزایش شفافیت با افزایش غلظت کمک‌حلال اشاره کرده‌اند، همخوانی دارد.

توان و زمان اولتراسوند نیز اثرات مثبت مستقیمی بر شفافیت داشتند. افزایش توان از ۲۸۰ به ۴۰۰ وات و زمان از ۹۰ به ۱۵۰ ثانیه، هر دو منجر به افزایش تدریجی شفافیت شدند. این مشاهده با تشدید پدیده کاویتاسیون در توان‌های بالاتر و زمان‌های طولانی‌تر قابل توجیه است؛ زیرا افزایش انرژی ورودی باعث تولید حباب‌های بیشتر و فروپاشی شدیدتر آن‌ها می‌شود که نیروهای برشی قوی‌تری برای شکستن قطرات ایجاد می‌کند (Suslick, 2020; Carpenter & Saharan, 2017). نمودارهای سطح پاسخ نشان دادند که حداکثر شفافیت در ترکیب توان بالا (۴۰۰ وات)، زمان کافی (۱۵۰ ثانیه)، غلظت بالای توپین ۸۰ (۲۰٪) و غلظت متوسط اسانس (۴٪) حاصل می‌شود. افزایش غلظت اسانس به ۵٪ حتی در توان بالا، منجر به کاهش شفافیت شد که ناشی از افزایش نسبت فاز پراکنده و کاهش کارایی پوشش سطحی است (شکل ۳). این الگو با نتایج مطالعه Abbasi (2023) بر روی نانومولسیون زعفران که نشان دادند افزایش غلظت اسانس فراتر از ۴٪ منجر به کاهش کیفیت امولسیون می‌شود، همخوانی دارد.

۳-۲-۲- تأثیر بر پایداری اولیه

غلظت توپین ۸۰ قوی‌ترین اثر را بر افزایش پایداری اولیه داشت ($F\text{-value} = 526.49, p < 0.0001$). در غلظت‌های پایین توپین ۸۰ (۱٪)، پایداری اولیه بسیار پایین (۴۵-۶۵٪) بود که ناشی از پوشش ناقص سطح قطرات و کوالانس است. با افزایش غلظت توپین ۸۰ به ۲۰٪، پایداری اولیه به ۱۰۰٪ رسید. PG نیز اثر مثبت و تکمیلی داشت؛ افزایش آن از ۵٪ به ۱۰٪، پایداری را تا ۱۰۰٪ بهبود بخشید. این بهبود ناشی از نقش PG به عنوان کوسورفکتانت در فشرده‌سازی لایه سطحی و افزایش ویسکوزیته فاز پیوسته است (شکل ۴). توان و زمان اولتراسوند نیز اثرات مثبت معناداری بر پایداری اولیه داشتند. بهترین پایداری (۱۰۰٪) زمانی حاصل شد که هر دو پارامتر فرآیندی در سطوح بالای خود (توان ۴۰۰ وات و زمان ۱۵۰ ثانیه) همراه با غلظت‌های بالای توپین ۸۰ (۲۰٪) و PG (۱۰٪) بودند.

۳-۲-۳- تعیین شرایط بهینه

با جمع‌بندی و تحلیل جامع داده‌های آماری حاصل از طراحی سطح پاسخ و نیز مشاهدات آزمایشگاهی در بخش‌های پیشین، شرایط بهینه برای دستیابی به یک نانومولسیون پایدار، شفاف و با عملکرد مناسب از اسانس زعفران تعیین گردید. هدف نهایی، دستیابی به تعادلی میان کوچک‌ترین اندازه ذرات، بالاترین پتانسیل زتا (پایداری الکتروستاتیک)، حداکثر شفافیت و پایداری فیزیکی اولیه، ضمن در نظر گرفتن کارایی فرآیند و ملاحظات اقتصادی و کاربردی فرمولاسیون بود.

بر اساس تحلیل‌های آماری، مدل درجه دوم (Quadratic) به عنوان مدل برتر برای پیش‌بینی رفتار سیستم انتخاب شد. نتایج ANOVA نشان داد که در میان کلیه پارامترهای مورد مطالعه، غلظت توپین ۸۰ قوی‌ترین و معنادارترین اثر را بر روی پاسخ‌های کلیدی از جمله کاهش اندازه ذرات، افزایش شفافیت و بهبود پایداری اولیه دارد. پارامترهای فرآیندی توان و زمان اولتراسوند نیز اثرات معنادار و غالب خود را بر کاهش اندازه ذرات و بهبود پایداری و شفافیت نشان دادند، به طوری که افزایش هر دو عامل تأثیر هم‌افزایی بر بهبود ویژگی‌های نهایی داشت.

با در نظر گرفتن تمامی منحنی‌های سطح پاسخ، نقاط بهینه پیش‌بینی شده توسط مدل، و نیز اولویت‌های عملی فرمولاسیون یک طعم‌دهنده غذایی (از جمله شفافیت بالا، پایداری فیزیکی و الکتریکی مناسب، و شدت طعم کافی)، فرمولاسیون و شرایط فرآیندی نهایی بهینه به شرح زیر پیشنهاد می‌گردد: فرمولاسیون مناسب: توپین ۸۰ (۱۰ درصد)، پروپیلن گلیکول (۹ درصد)، اسانس

زعفران (۳.۵ درصد)، آب تا ۱۰۰ درصد، شرایط بهینه فرآیند اولتراسونیک: توان دستگاه ۳۶۰ وات (معادل ۹۰٪)، زمان صوت‌دهی ۱۵۰ ثانیه.

لازم به ذکر است که درصدهای گزارش‌شده برای توپین ۸۰ (۱۰٪) و پروپیلن گلیکول (۹٪) مربوط به فرمولاسیون تغلیظ‌شده (کنسانتره) است که به عنوان ماده اولیه در صنعت طعم‌دهندگی استفاده می‌شود و در محصول نهایی با نسبت حدود ۱:۱۰۰۰ یا کمتر رقیق می‌شود. به عنوان مثال، با افزودن ۰/۱ درصد از این کنسانتره به نوشیدنی نهایی، مقدار نهایی توپین ۸۰ در محصول نهایی حدود ۰.۰۱٪ (۱۰۰ ppm) خواهد بود که به مراتب کمتر از حد مجاز تعیین‌شده توسط سازمان‌های نظارتی (حدود ۵-۱۰ گرم بر کیلوگرم) است (FDA, 2023; EFSA, 2015). همچنین این نسبت‌های بالا در کنسانتره برای دستیابی همزمان به شفافیت ایده‌آل (۹۳.۱٪) و پایداری فیزیکی کامل (۱۰۰٪) ضروری بوده و کاهش آن‌ها منجر به افت قابل‌توجه کیفیت محصول نهایی می‌شود.

۳-۳- تعیین فرمولاسیون نهایی و آنالیزهای تکمیلی

پس از تعیین فرمولاسیون و شرایط فرآیندی بهینه بر اساس تحلیل‌های آماری RSM، نمونه نهایی با استفاده از مقادیر بهینه (توپین ۸۰ ۱۰٪، پروپیلن گلیکول ۹٪، اسانس زعفران ۳.۵٪، توان ۳۶۰ وات، زمان ۱۵۰ ثانیه) تهیه گردید. جهت اطمینان از کیفیت محصول نهایی و تأیید نتایج بهینه‌سازی، آنالیزهای تکمیلی بر روی این نمونه انجام شد.

از لحاظ ظاهری، اسانس امولسیون تهیه شده یک مایع کاملاً شفاف زرد رنگ است (تصویر سمت چپ شکل ۵). شفافیت کامل امولسیون تهیه شده دستاورد بسیار مهمی در زمینه تهیه اسانس‌های امولسیونی است، زیرا معمولاً مواد امولسیونی را به ندرت می‌توان به صورت کاملاً شفاف فرمولاسیون و تهیه کرد. شفافیت محصول تهیه شده می‌تواند دامنه کاربرد آن را برای نوشیدنی‌های شفاف (مانند آب طعم‌دار) گسترش دهد. همچنین پایه آبی این فرمولاسیون بسیار حائز اهمیت است، چرا که با این روش یک اسانس نامحلول در آب به یک اسانس محلول در آب تبدیل شده است. در تصویر مربوطه نشان داده شده است که اسانس زعفران پایه در آب حل نمی‌شود و به صورت کاملاً دو فازی با آب قرار می‌گیرد (تصویر سمت راست)، اما وقتی همان اسانس در یک امولسیون پایه آب فرموله شده است به صورت یک مایع کاملاً یکنواخت، پایدار و شفاف ایجاد می‌شود.

نتایج آزمون DLS نشان داد که نمونه امولسیونی بهینه دارای میانگین اندازه ذرات بسیار پایین ۱۴.۷ نانومتر است (شکل ۶). دستیابی به چنین اندازه ذراتی در حوزه امولسیون‌های غذایی بسیار سخت است و اکثر امولسیون‌های غذایی در ابعاد میکرومتر هستند. با این وجود در محصول حاضر با بهینه‌سازی و کنترل دقیق تمام پارامترها و نیز انتخاب فرمولاسیون مناسب، دستیابی به چنین اندازه ذرات ریزی قابل حصول شده است. از این داده مشخص می‌شود که ویژگی‌های منحصر به فرد امولسیون تهیه شده همچون پایداری بالا و شفافیت عالی نتیجه دستیابی به چنین ابعاد نانومتری است. کاهش اندازه ذرات به زیر ۵۰ نانومتر یک دستاورد فنی قابل توجه محسوب می‌شود، زیرا ذرات در این ابعاد از پراکندگی نور رایی کمتری برخوردار بوده و شفافیت افزایش می‌یابد.

شاخص پراکندگی (PDI) برای نمونه بهینه ۰/۲۱۰ ثبت گردید که نشان‌دهنده توزیع اندازه نسبتاً باریک و تک‌پراکنش بودن سیستم است (مقادیر PDI بین ۰.۱ تا ۰.۲۵ معمولاً برای نانوامولسیون‌های با توزیع یکنواخت قابل قبول محسوب می‌شود). عدد پتانسیل زتای نمونه تهیه شده ۴۵.۱۸- میلی‌ولت بود. از منظر پایداری کلوئیدی، این مقدار عالی تلقی می‌شود. طبق قرارداد، مقادیر پتانسیل زتای بزرگ‌تر از ۳۰- میلی‌ولت یا کوچک‌تر از ۳۰+ میلی‌ولت نشان‌دهنده یک سوسپانسیون با پایداری الکتروستاتیک مطلوب است. مقدار ۴۵.۱۸- میلی‌ولت نشان می‌دهد که ذرات از دافعه الکتروستاتیک قوی برخوردارند که مانع از نزدیکی، لخته شدن و کوالانسانس آن‌ها می‌گردد (شکل ۷).

در ادامه و به منظور تأیید بصری نتایج حاصل از آنالیز پراکندگی نور دینامیکی (DLS) و بررسی مستقیم مورفولوژی نانوذرات، تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) از نمونه نهایی نانوامولسیون زعفران تهیه گردید. همان‌طور که در شکل ۸ مشاهده می‌شود، تصاویر TEM در دو بزرگنمایی متفاوت (مقیاس ۱۰۰ نانومتر و ۵۰ نانومتر) به وضوح تشکیل قطرات نانوامولسیون با

مورفولوژی کروی و توزیع اندازه نسبتاً یکنواخت را نشان می‌دهند. در تصویر با مقیاس ۱۰۰ نانومتر، قطرات نانومولسیون به صورت ذراتی با اندازه تقریبی در محدوده ۱۵-۲۰ نانومتر قابل مشاهده هستند و در تصویر با بزرگنمایی بیشتر و مقیاس ۵۰ نانومتر، این ابعاد با وضوح بیشتری تأیید می‌شود. این مشاهدات با نتایج DLS که میانگین اندازه هیدرودینامیکی ۱۴۷ نانومتر را گزارش کرده بود، همخوانی بسیار خوبی دارد. نکته حائز اهمیت این است که اندازه واقعی ذرات در تصاویر TEM اندکی کوچک‌تر از مقادیر DLS است که این امر کاملاً قابل انتظار می‌باشد، زیرا روش DLS قطر هیدرودینامیکی (شامل لایه حلال و زنجیره‌های امولسیفایر متصل به سطح) را اندازه‌گیری می‌کند در حالی که TEM قطر هسته خشک ذره را نشان می‌دهد. بررسی کیفی تصاویر نشان می‌دهد که قطرات از توزیع اندازه نسبتاً باریک و یکنواختی برخوردارند و ذرات بسیار درشت یا تجمعات بزرگ به ندرت مشاهده می‌شوند. این یکنواختی نشان‌دهنده کارایی بالای فرآیند بهینه‌سازی شده اولتراسوند و همچنین فرمولاسیون مناسب در تولید قطرات یکنواخت نانومتری است. توزیع یکنواخت اندازه ذرات از نظر تئوری عاملی کلیدی در پایداری نانومولسیون در برابر پدیده رسیدن اسوالد محسوب می‌شود. علاوه بر این، در تصاویر TEM هیچ نشانه‌ای از تجمع یا ادغام قطرات مشاهده نمی‌شود و ذرات به صورت مجزا و پراکنده در سراسر میدان دید قرار دارند. این مشاهدات با نتایج پتانسیل زتای ۴۵.۱۸- میلی‌ولت (نشان‌دهنده دافعه الکترواستاتیک قوی) و همچنین پایداری فیزیکی ۱۰۰٪ در آزمون‌های مختلف (سانتریفیوژ، پایداری حرارتی و نگهداری طولانی‌مدت) همخوانی کامل دارد. در مجموع، تصاویر TEM تهیه شده از نانومولسیون بهینه زعفران، موفقیت فرآیند بهینه‌سازی را در سه جنبه کلیدی به اثبات می‌رسانند: دستیابی به ابعاد واقعی نانومتری (۱۵-۲۰ نانومتر) که با نتایج DLS همخوانی دارد، مورفولوژی کروی و توزیع اندازه یکنواخت که نشان‌دهنده کیفیت بالای فرآیند امولسیون‌سازی است، و عدم وجود تجمع یا ادغام ذرات که بیانگر پایداری بالای کلوئیدی سیستم می‌باشد. این مشاهدات بصری، شواهد محکمی بر اعتبار رویکرد بهینه‌سازی انجام شده و کیفیت استثنایی محصول نهایی ارائه می‌دهند.

نمونه بهینه دارای پایداری ۱۰۰ درصدی پس از اعمال تست سانتریفیوژ (۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه) بوده و درصد عبور نور از آن نیز حدود ۹۳.۱ درصد است که نشان‌دهنده شفافیت بالا و مقاومت عالی در برابر جدایش فازی تحت نیروهای مکانیکی شدید می‌باشد. این آزمون شتاب‌یافته، مقاومت سیستم در برابر نیروهای گریز از مرکز شدید (شبیه‌سازی شرایط استرس مکانیکی) را می‌سنجد. نتیجه ۱۰۰٪ بر استحکام ساختاری نانومولسیون تأکید دارد و نشان می‌دهد که ذرات ریز تولیدشده، به لطف پوشش امولسیفایری قوی و پتانسیل زتای بالا، در برابر لخته شدن و جدایش مقاومت بالایی دارند.

نتایج این پژوهش به‌وضوح نشان می‌دهد که کاهش اندازه ذرات به ۱۴۷ نانومتر تأثیر مستقیمی بر افزایش شفافیت (۹۳.۱٪) و پایداری فیزیکی (۱۰۰٪) داشته است. این ارتباط زنجیره‌ای را می‌توان با سه مکانیسم اصلی توضیح داد: ۱- ذرات ریزتر پراکندگی نور کمتری دارند که منجر به شفافیت بالاتر می‌شود (Mason et al., 2006; Arteaga et al., 2023)، ۲- ذرات ریزتر دارای نسبت سطح به حجم بالاتری هستند که باعث جذب مؤثرتر امولسیفایر و تشکیل لایه محافظ قوی‌تر می‌شود (Dickinson, 2009; McClements, 2021)، و ۳- ذرات ریزتر دارای تحرک براونی بیشتری بوده و نیروی گرانشی مؤثر بر آن‌ها کاهش می‌یابد که این امر پایداری در برابر جدایش فازی را بهبود می‌بخشد (Wooster et al., 2008). پتانسیل زتای ۴۵.۱۸- میلی‌ولت نیز نشان‌دهنده دافعه الکترواستاتیک قوی بین ذرات است که از تجمع و لخته شدن آن‌ها جلوگیری می‌کند (Salvia-Trujillo et al., 2015). این یافته‌ها با نتایج مطالعه Salvia-Trujillo و همکاران که بر روی نانومولسیون‌های حاوی اسانس‌های مختلف نشان

دادند کاهش اندازه ذرات به زیر ۵۰ نانومتر به‌طور چشمگیری شفافیت و پایداری را افزایش می‌دهد، همخوانی کامل دارد. همچنین پایداری ۱۰۰٪ مشاهده‌شده در این پژوهش را می‌توان به ترکیب سه سازوکار نسبت داد: ۱- پایداری استریک ناشی از زنجیره‌های پلی‌اتیلن گلیکول توپین ۸۰ که یک سد فیزیکی در برابر نزدیک شدن قطرات ایجاد می‌کند (Dickinson, 2009)، ۲- پایداری الکترواستاتیک ناشی از بار سطحی منفی بالا (۴۵.۱۸- میلی‌ولت) که باعث دافعه بین قطرات می‌شود. این یافته‌ها با نتایج مطالعه Gupta و همکاران که نشان دادند ترکیب پایداری استریک و الکترواستاتیک می‌تواند پایداری طولانی‌مدت (تا ۱۸ ماه) برای نانومولسیون‌ها ایجاد کند، همخوانی کامل دارد. این ویژگی یک مزیت رقابتی مهم نسبت به سامانه‌های با پایداری صرفاً

الکترواستاتیک محسوب می‌شود، زیرا سامانه‌های با پایداری غالباً الکترواستاتیک در حضور الکترولیت‌ها دچار لخته‌شدن می‌شوند (Rao & McClements, 2012; Koroleva & Yurtov, 2022).

براساس آنالیز GC-MS، مقدار سافرانال (ماده اصلی اسانس زعفران) در نانوامولسیون بهینه ۲۹.۵۲ درصد بود. سافرانال مهم‌ترین ترکیب معطر در اسانس زعفران است که به عنوان یک مونوترپن آلدئیدی طبقه‌بندی می‌شود و مسئول عطر متمایز و خاص زعفران می‌باشد. میزان سافرانال در اسانس زعفران به عنوان شاخص اصلی کیفیت و مرغوبیت آن محسوب می‌شود. این مقدار نشان‌دهنده آن است که فرآیند تولید نانوامولسیون (به ویژه مرحله اولتراسوند با انرژی کنترل‌شده) منجر به تخریب یا از دست رفتن قابل توجه این ترکیب ارزشمند نشده است. حفظ یکپارچگی سافرانال، کارایی عملکردی نانوامولسیون را به عنوان یک طعم‌دهنده قوی و معتبر تضمین می‌کند. از سوی دیگر، حفظ ۲۹.۵۲٪ سافرانال در نانوامولسیون در مقایسه با مطالعاتی که کاهش قابل توجه ترکیبات فرار را در طی فرآیند اولتراسوند گزارش کرده‌اند (Jafari et al., 2008; Kentish et al., 2008)، نشان‌دهنده کنترل موفق شرایط فرآیند (دمای زیر ۴۰ درجه و زمان کوتاه ۱۵۰ ثانیه) در این پژوهش است.

به منظور بررسی عینی تأثیر ویژگی‌های منحصربه‌فرد نانوامولسیون اسانس زعفران (از جمله اندازه نانومتری ذرات، توزیع یکنواخت و پایداری بالا) بر عملکرد حسی نهایی، یک مطالعه ارزیابی حسی تطبیقی طراحی و اجرا گردید. در این ارزیابی، نمونه نانوامولسیون بهینه‌شده با اسانس زعفران غیرامولسیونی در دو حالت مختلف مورد مقایسه قرار گرفت: (۱) بلافاصله پس از تهیه و (۲) پس از افزوده شدن به یک بستر نوشیدنی. ارزیابی با استفاده از روش هدونیک (Hedonic Scale) ۵ نقطه‌ای (۱: کاملاً نامطلوب، ۵: کاملاً مطلوب) انجام شد. نتایج این ارزیابی تطبیقی در جدول‌های ۲ و ۳ ارائه شده است. نتایج به وضوح نشان‌دهنده برتری معنادار نمونه نانوامولسیونی در تمامی جنبه‌های حسی است. در هر دو حالت آزمایش، نمونه نانوامولسیونی میانگین امتیاز ۴.۹ از ۵ را با انحراف معیار بسیار پایین (± 0.1) در هر سه شاخص مطلوبیت بو، طعم و کلی کسب نمود. این در حالی است که نمونه غیرامولسیونی پایه در بهترین حالت میانگین امتیاز ۴.۸ را با پراکندگی نسبی بیشتری ($\pm 0.2-0.1$) دریافت کرد.

برتری حسی نانوامولسیون را می‌توان مستقیماً به ویژگی‌های نانوساختاری آن نسبت داد. اندازه بسیار ریز ذرات (۱۴.۷ نانومتر) و سطح ویژه فوق‌العاده بالا، امکان رهایش کارآمدتر و یکنواخت‌تر ترکیبات معطر فرار را فراهم می‌سازد. این امر منجر به تشکیل پروفایل بویایی قوی‌تر، واضح‌تر و مطلوب‌تر در فضای بالای نمونه می‌گردد. از سوی دیگر، توزیع یکنواخت ذرات نانومتری در فاز آبی، از ایجاد نقاط کانونی با غلظت بالا که می‌توانند باعث احساس تند یا تلخی موضعی شوند، جلوگیری کرده و تجربه چشایی ملایم‌تر و یکدست‌تری ایجاد می‌نماید.

۳-۴-آزمون‌های پایداری

ارزیابی پایداری نانوامولسیون‌های غذایی تحت شرایط مختلف نگهداری و فراوری، گامی ضروری برای تعیین ماندگاری و قابلیت اطمینان آن‌ها در کاربردهای واقعی است. در این راستا، نمونه بهینه نانوامولسیون زعفران تحت یک سری آزمون‌های پایداری شتاب‌یافته و فرآیندی قرار گرفت.

۳-۴-۱-پایداری حرارتی و زمانی

نتایج حاصل از آزمون‌های پایداری (جدول ۴) پایداری فیزیکی و نوری قابل توجه نانوامولسیون بهینه‌شده را در شرایط چالش‌برانگیز به وضوح نشان می‌دهد. در طول دوره چهار هفته نگهداری در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد، هیچ گونه تغییر ماکروسکوپی در ظاهر نمونه مشاهده نشد و نمونه به صورت یک مایع همگن، شفاف و فاقد هرگونه نشانه‌ای از جدایش فاز، رسوب یا کدرشدن باقی ماند. شاخص کمی پایداری فیزیکی نیز در تمام بازه‌های زمانی ثابت و در مقدار ۱۰۰٪ حفظ شد که بیانگر استحکام ساختاری پایدار سیستم در برابر عوامل ناپایدارکننده در دمای بالا است.

اندازه‌گیری درصد عبور نور به عنوان شاخص حساس تغییرات ریزساختاری، نتایج جالب توجهی ارائه نمود. مقدار عبور نور نمونه اولیه ۹۳.۱٪ بود. در طول چهار هفته نگهداری در ۴۵ درجه سانتی‌گراد، این مقدار بین ۹۲.۵ تا ۹۳.۵٪ در نوسان بود. این محدوده تغییرات، بیانگر یک ثبات اپتیکال بسیار بالا است، به طوری که حداکثر افت مشاهده شده تنها حدود ۰.۶ واحد درصد نسبت به

نمونه اولیه می‌باشد. چنین تغییر ناچیزی را می‌توان در محدوده خطای اندازه‌گیری دستگاه دانست و نمی‌توان آن را به یک تغییر معنادار در اندازه ذرات یا یکنواختی سیستم نسبت داد. این پایداری نوری نشان می‌دهد که فرآیندهای ناپایداری بالقوه مانند رشد قطرات یا لخته شدن در این سیستم به شکل مؤثری توسط فرمولاسیون بهینه مهار شده‌اند. آزمون پاستوریزاسیون که یک فرآیند حرارتی رایج در صنعت غذاست (۷۵ درجه سانتی‌گراد، ۱۵ دقیقه)، نیز هیچ تأثیر منفی بر یکنواختی فیزیکی نمونه و پایداری آن نداشت. میزان عبور نور پس از این تیمار حرارتی ۹۲.۲٪ اندازه‌گیری شد که نشان‌دهنده مقاومت حرارتی قابل قبول سیستم است.

۲-۴-۳- پایداری در برابر انجماد، pH و قدرت یونی

نتایج ارزیابی پایداری در برابر تنش‌های فیزیکی‌شیمیایی در جدول ۵ ارائه شده است. نتایج حاصل از این سری آزمون‌ها، مقاومت قابل توجه و همه‌جانبه نانوامولسیون بهینه‌شده را در برابر تنش‌های مختلف نشان می‌دهد:

پایداری در برابر انجماد: عبور موفقیت‌آمیز از چرخه انجماد-ذوب (۲۴ ساعت در ۱۸- درجه سانتی‌گراد) بدون هیچ گونه تغییر ظاهری و با حداقل افت شفافیت (از ۹۳.۱٪ به ۹۲.۳٪)، نشان‌دهنده استحکام مکانیکی بالای ساختار نانوامولسیون است. این ویژگی حاکی از آن است که تشکیل کریستال‌های یخ در طی انجماد، منجر به تخریب فیلم امولسیفایری و کوالانس قطرات نشده است.

پایداری در برابر pH: حفظ پایداری کامل و شفافیت بالا در هر دو محیط اسیدی قوی (pH=2) و قلیایی (pH=9) به ترتیب با شفافیت ۹۲.۷٪ و ۹۲.۶٪، گواه سازگاری شیمیایی عالی سیستم فرمولاسیون است. این نتیجه نشان می‌دهد که سیستم امولسیفایری مورد استفاده (توین ۸۰ و پروپیلن گلیکول) در این محدوده pH پایدار است و تغییرات بار سطحی یا هیدرولیز موجب تجمع ذرات نمی‌شود.

پایداری در برابر قدرت یونی: حفظ پایداری ۱۰۰٪ و عدم تغییر در شفافیت (۹۳.۱٪) در حضور NaCl با غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار، نشان می‌دهد که مکانیسم غالب پایداری در این نانوامولسیون، پایداری استریک (ناشی از پوشش الیه امولسیفایری) بوده و کمتر متأثر از نیروهای الکترواستاتیک است. این یک مزیت بزرگ محسوب می‌شود، زیرا سیستم را در برابر تغییرات قدرت یونی محیط (مانند افزودن نمک یا مواد معدنی) مقاوم می‌سازد.

۳-۴-۳- مقایسه پایداری شیمیایی و حسی با نمونه غیرامولسیونی

به منظور ارزیابی جامع تأثیر فناوری نانوامولسیون‌سازی بر حفظ کیفیت کیفی و حسی اسانس زعفران در طول زمان و تحت شرایط استرس، یک مطالعه مقایسه‌ای دقیق بین نمونه نانوامولسیون بهینه و نمونه غیرامولسیونی (پایه) تحت آزمون‌های پایداری شتاب‌یافته حرارتی و پاستوریزاسیون انجام شد (جدول ۶). نتایج تفاوت فاحش بین دو سیستم را به وضوح نشان می‌دهد:

پایداری شیمیایی (درصد سافرانال): مقدار اولیه سافرانال در هر دو نمونه حدود ۲۹.۵۴٪ بود. در نمونه نانوامولسیونی، پس از ۴ هفته نگهداری در ۴۵ درجه سانتی‌گراد، درصد سافرانال به ۲۹.۳۱٪ رسید که نشان‌دهنده کاهشی بسیار ناچیز (حدود ۰.۸٪) است. حتی پس از فرآیند پاستوریزاسیون، مقدار سافرانال ۲۹.۲۶٪ اندازه‌گیری شد. در مقابل، نمونه غیرامولسیونی تخریب شدید و پیشرونده‌ای را تجربه نمود. پس از تنها یک هفته در ۴۵ درجه، سافرانال به ۲۳.۵۵٪ کاهش یافت (کاهش حدود ۲۰٪). این روند نزولی ادامه یافته و پس از ۴ هفته به ۱۸.۶۲٪ (کاهش حدود ۳۷٪) و پس از پاستوریزاسیون به ۱۴.۹٪ (کاهش حدود ۵۰٪) رسید. این ثبات عالی نانوامولسیون را می‌توان به نقش محافظتی ذرات نانوامولسیون نسبت داد که با ایجاد یک سد فیزیکی و کاهش سطح تماس مستقیم ترکیبات حساس با عوامل مخرب محیطی (مانند اکسیژن و حرارت)، از تخریب آن‌ها جلوگیری می‌کند.

پایداری حسی: روند تغییرات در ویژگی‌های حسی کاملاً با داده‌های شیمیایی همخوانی دارد. نمونه نانوامولسیونی امتیازات حسی خود را در تمامی مراحل آزمون حفظ کرد (۴.۸-۴.۹ از ۵)، در حالی که نمونه غیرامولسیونی افت فاحش و سریعی در مطلوبیت حسی از خود نشان داد. امتیازات این نمونه که در ابتدا حدود ۴.۸ بود، به طور پیوسته کاهش یافته و پس از ۴ هفته در ۴۵ درجه

به حدود ۳-۴ و پس از پاستوریزاسیون به حدود ۰-۳ (یعنی نامطلوب تا کاملاً نامطلوب) سقوط کرد. این کاهش شدید مستقیماً با تخریب گسترده ترکیبات آروماتیک (کاهش ۵۰٪ سافرانال) مرتبط است.

این مطالعه مقایسه‌ای به روشنی ثابت می‌کند که فناوری نانوامولسیون‌سازی نه تنها یک برتری فیزیکی (پایداری ظاهری)، بلکه یک برتری شیمیایی و عملکردی عمیق برای اسانس زعفران ایجاد می‌کند. سیستم نانوامولسیون به عنوان یک سامانه رهایش و محافظت کارآمد عمل کرده و با جلوگیری از تخریب ترکیبات کلیدی مانند سافرانال، ماندگاری عطر و طعم، کیفیت حسی و در نهایت ارزش افزوده محصول نهایی را به میزان قابل توجهی افزایش می‌دهد.

۴- نتیجه گیری

در این پژوهش، نانوامولسیون خوراکی زعفران بر پایه آب با استفاده از روش سطح پاسخ با موفقیت بهینه‌سازی و تولید شد. نتایج نشان داد که سیستم امولسیفایری متشکل از توپین ۸۰ و پروپیلن گلیکول، همراه با فرآیند اولتراسوند کنترل‌شده، قادر به تولید نانوذراتی با ابعاد بسیار ریز، شفافیت استثنایی و پایداری فیزیکی کامل در برابر تنش‌های محیطی متداول در صنایع غذایی است. حفظ یکپارچگی ترکیب معطر کلیدی (سافرانال) و برتری حسی معنادار نسبت به اسانس غیرامولسیونی، نشان‌دهنده کارایی این سامانه در ارائه عطر و طعم مطلوب در محصولات نهایی است. این فناوری با تبدیل یک اسانس نامحلول در آب به سامانه‌ای شفاف و پایدار، امکان استفاده از زعفران را در طیف گسترده‌ای از محصولات غذایی پایه آبی از جمله نوشیدنی‌های شفاف، شربت‌ها و دسرهای لبنی فراهم می‌کند. پیامد اقتصادی این دستاورد، کاهش هزینه‌های تولید از طریق حذف حلال‌های آلی و افزایش ماندگاری محصول، و همچنین پاسخگویی به تقاضای رو به رشد مصرف‌کنندگان برای محصولات با برجسب پاک است. با وجود نتایج موفقیت‌آمیز، این پژوهش در مقیاس آزمایشگاهی انجام شده است و برای تجاری‌سازی، بررسی چالش‌های تولید در مقیاس نیمه‌صنعتی و صنعتی ضروری به نظر می‌رسد. همچنین پیشنهاد می‌شود در پژوهش‌های آتی، امکان جایگزینی امولسیفایرهای سنتزی با ترکیبات طبیعی (مانند پروتئین‌های گیاهی یا صمغ‌های اصلاح‌شده) به منظور تولید محصولی با برجسب پاک‌تر و نیز بررسی زیست‌فراهمی و رهایش کنترل‌شده ترکیبات فعال در شرایط شبیه‌سازی‌شده دستگاه گوارش مورد مطالعه قرار گیرد.

تعرض منافع

هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند مراتب تشکر صمیمانه خود را از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران و شرکت دنیای عطر و طعم دیارا که حمایت مالی این طرح را برعهده داشت، اعلام نمایند.

مراجع

- Abismail, B., Canselier, J. P., Wilhelm, A. M., Delmas, H., & Gourdon, C. (1999). Emulsification by ultrasound: drop size distribution and stability. *Ultrasonics Sonochemistry*, 6(1-2), 75-83. [https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(98\)00027-3](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(98)00027-3)
- Acevedo-Fani, A., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2017). Nanoemulsions as edible coatings. *Current Opinion in Food Science*, 15, 43-49. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.05.012>
- Arteaga, J. F., Ruiz-Montoya, M., Palma, A., Alonso, G., & Pintado, S. (2023). Optical properties of nanoemulsions: Effect of droplet size on transparency. *Food Hydrocolloids*, 134, 108012. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108012>
- Assadpour, E., & Jafari, S. M. (2019). A systematic review on nanoencapsulation of food bioactive ingredients and nutraceuticals by various nanocarriers. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(19), 3129-3151. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1484687>
- Bouchemal, K., Briançon, S., Perrier, E., & Fessi, H. (2004). Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. *International Journal of Pharmaceutics*, 280(1-2), 241-251. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.05.016>

- Canselier, J. P., Delmas, H., Wilhelm, A. M., & Abismail, B. (2002). Ultrasound emulsification—an overview. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 23(1-3), 333-349. <https://doi.org/10.1080/01932690208984209>
- Cardoso-Ugarte, G. A., & Sosa-Morales, M. E. (2022). Essential oils from herbs and spices in food preservation. In *Herbs, Spices and Their Roles in Nutraceuticals and Functional Foods* (pp. 215-234). Academic Press.
- Carpenter, J., & Saharan, V. K. (2017). Ultrasonic assisted formation and stability of mustard oil in water nanoemulsion: Effect of process parameters and their optimization. *Ultrasonics Sonochemistry*, 35, 422-430. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.10.021>
- Choi, A. J., Kim, C. J., Cho, Y. J., Hwang, J. K., & Kim, C. T. (2009). Effects of surfactants on the formation and stability of capsaicin-loaded nanoemulsions. *Food Science and Biotechnology*, 18(5), 1161-1172.
- Dickinson, E. (2009). Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food Hydrocolloids*, 23(6), 1473-1482. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.08.005>
- Esfanjani, A. F., & Jafari, S. M. (2016). Biopolymer nano-particles and natural nano-carriers for nano-encapsulation of phenolic compounds. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 146, 532-543. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.06.049>
- Floury, J., Bellettre, J., Legrand, J., & Desrumaux, A. (2004). Analysis of a new type of high pressure homogeniser: A study of the flow pattern. *Chemical Engineering Science*, 59(4), 843-853. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2003.11.016>
- Gahruie, H. H., Eskandari, M. H., Van der Meeren, P., & Hosseini, S. M. H. (2020). Current trends in the development of nanoemulsions: A review of the state of the art. *Trends in Food Science & Technology*, 105, 105-122. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.08.018>
- Garti, N., & Aserin, A. (2015). Co-surfactants in microemulsions and nanoemulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 20(4), 234-242.
- Griffin, W. C. (1954). Calculation of HLB values of non-ionic surfactants. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, 5(4), 249-256.
- Gupta, A., Eral, H. B., Hatton, T. A., & Doyle, P. S. (2016). Nanoemulsions: formation, properties and applications. *Soft Matter*, 12(11), 2826-2841. <https://doi.org/10.1039/C5SM02958A>
- Gupta, T. B., & Jaiswal, A. K. (2023). Nanoemulsions of essential oils for food preservation and safety. *Food Control*, 147, 109577. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109577>
- Guttoff, M., Saberi, A. H., & McClements, D. J. (2015). Formation of vitamin D nanoemulsion delivery systems: Impact of emulsifier type on physicochemical properties and stability. *Food Chemistry*, 187, 130-137. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.068>
- Hashtjin, A. M., & Abbasi, S. (2023). Optimization of ultrasonic-assisted production of saffron essential oil nanoemulsion. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 17(2), 1456-1468.
- Hosseini, S. M. H., & Jafari, S. M. (2020). Nanoemulsion formation by phase inversion and low-energy methods. In *Nanoemulsions in Food Technology* (pp. 45-78). CRC Press.
- Israelachvili, J. N. (2011). *Intermolecular and Surface Forces* (3rd ed.). Academic Press.
- Jafari, S. M., Assadpoor, E., Bhandari, B., & He, Y. (2008). Nano-particle encapsulation of fish oil by spray drying. *Food Research International*, 41(2), 172-183. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.11.002>
- Jafari, S. M., He, Y., & Bhandari, B. (2007). Optimization of nano-emulsions production by microfluidization. *European Food Research and Technology*, 225(5), 733-741. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0471-9>
- Jafari, S. M., & McClements, D. J. (Eds.). (2018). *Nanoemulsions: Formulation, Applications, and Characterization*. Academic Press.
- Karthik, P., Ezhilarasi, P. N., & Anandharamakrishnan, C. (2017). Methods for nanoemulsion production. In *Nanoemulsions: Formulation, Applications, and Characterization* (pp. 139-160). Academic Press.
- Kentish, S., Wooster, T. J., Ashokkumar, M., Balachandran, S., Mawson, R., & Simons, L. (2008). The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(2), 170-175. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.07.005>

- Komaiko, J. S., & McClements, D. J. (2015). Low-energy formation of edible nanoemulsions by spontaneous emulsification: Factors influencing particle size. *Journal of Food Engineering*, 146, 122-128. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.09.003>
- Koroleva, M. Y., & Yurtov, E. V. (2022). Nanoemulsions: The properties, methods of preparation and promising applications. *Russian Chemical Reviews*, 91(5), RCR5039. <https://doi.org/10.1070/RCR5039>
- Kumar, R., Kaur, K., Uppal, S., & Mehta, S. K. (2022). Nanoemulsion-based approaches for enhancing the bioavailability of lipophilic bioactive compounds. *Journal of Controlled Release*, 348, 705-730. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.06.022>
- Lee, L., & Norton, I. T. (2022). High-energy emulsification methods for food nanoemulsions. *Current Opinion in Food Science*, 44, 100812. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2022.100812>
- Li, P. H., & Chiang, B. H. (2012). Process optimization and stability of D-limonene-in-water nanoemulsions prepared by ultrasonic emulsification using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19(1), 192-197. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2011.06.007>
- Lu, W., Kelly, A. L., & Miao, S. (2022). Fabrication of citrus essential oil nanoemulsions: Effect of processing parameters on droplet size and stability. *Food Hydrocolloids*, 122, 107088. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107088>
- Mason, T. G., Wilking, J. N., Meleson, K., Chang, C. B., & Graves, S. M. (2006). Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 18(41), R635. <https://doi.org/10.1088/0953-8984/18/41/R01>
- McClements, D. J. (2020). Advances in edible nanoemulsions: Digestion, bioavailability, and potential toxicity. *Progress in Lipid Research*, 80, 101081. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2020.101081>
- McClements, D. J. (2021). Advances in edible nanoemulsions: Digestion, bioavailability, and potential toxicity. *Annual Review of Food Science and Technology*, 12, 223-247. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-062320-113542>
- McClements, D. J., & Jafari, S. M. (2018). Improving emulsion formation, stability and performance using mixed emulsifiers: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 251, 55-79. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.12.001>
- Moradi, S., & Kousheh, S. A. (2024). Saffron nanoemulsions: An emphasis on the two recent patents for ultrasonic nanoemulsion of saffron. *Journal of Food Biosciences and Technology*, 14(2), 45-58.
- Rao, J., & McClements, D. J. (2011). Formation of flavor oil microemulsions, nanoemulsions and emulsions: Influence of composition and preparation method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(9), 5026-5035. <https://doi.org/10.1021/jf200208m>
- Rao, J., & McClements, D. J. (2012). Food-grade nanoemulsions: Formulation, fabrication, properties, performance, and potential application. *Soft Matter*, 8(7), 2297-2316. <https://doi.org/10.1039/C2SM06979A>
- Salvia-Trujillo, L., Rojas-Graü, M. A., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2014). Effect of processing parameters on the physicochemical properties of thyme oil nanoemulsions. *Food and Bioprocess Technology*, 7(12), 3494-3504. <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1369-8>
- Salvia-Trujillo, L., Rojas-Graü, M. A., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2015). Physicochemical characterization and antimicrobial activity of food-grade emulsions and nanoemulsions incorporating essential oils. *Food Hydrocolloids*, 43, 547-556. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.07.012>
- Salvia-Trujillo, L., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2020). Nanoemulsions for food applications: Development and characterization. In *Handbook of Food Nanotechnology* (pp. 163-192). Academic Press.
- Schultz, S., Wagner, G., Urban, K., & Ulrich, J. (2021). High-pressure homogenization for the production of nanoemulsions: A review. *Chemical Engineering & Technology*, 44(5), 789-802. <https://doi.org/10.1002/ceat.202000532>
- Shen, Q. J., Sun, J. Y., Pan, J. N., Yu, T., & Zhou, W. W. (2024). Synergistic antimicrobial potential of essential oil nanoemulsion and ultrasound and application in food industry: A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 98, 103867. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2024.103867>

- Silva, H. D., Cerqueira, M. A., & Vicente, A. A. (2012). Nanoemulsions for food applications: Development and characterization. *Food and Bioprocess Technology*, 5(3), 854-867. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0683-7>
- Solans, C., Izquierdo, P., Nolla, J., Azemar, N., & Garcia-Celma, M. J. (2005). Nano-emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 10(3-4), 102-110. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2005.06.004>
- Suslick, K. S. (2020). Sonochemistry and the acoustic cavitation. *Annual Review of Physical Chemistry*, 71, 1-28. <https://doi.org/10.1146/annurev-physchem-071119-040127>
- Sworn, G. (2021). Xanthan gum: Applications in food and other industries. In *Handbook of Hydrocolloids* (3rd ed., pp. 551-576). Woodhead Publishing.
- Tadros, T., Izquierdo, P., Esquena, J., & Solans, C. (2004). Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 108-109, 303-318. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2003.10.023>
- Tastan, O., & Baysal, T. (2022). Application of nanoemulsion technology for essential oil preservation in beverages. *Journal of Food Processing and Preservation*, 46(8), e16850. <https://doi.org/10.1111/jfpp.16850>
- Wooster, T. J., Golding, M., & Sanguansri, P. (2008). Impact of oil type on nanoemulsion formation and Ostwald ripening stability. *Langmuir*, 24(22), 12758-12765. <https://doi.org/10.1021/la801685v>

جدول ۱: تاثیر امولسیفایرها و کمک امولسیفایرهای مختلف بر حالت اولیه، شفافیت و پایداری اولیه امولسیونها

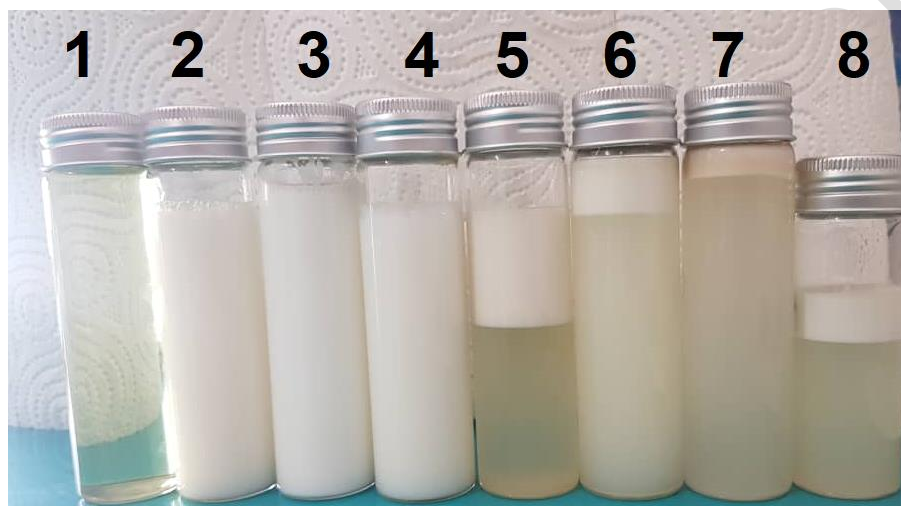
Table 1. Effect of different emulsifiers and co-emulsifiers on initial state, transparency, and initial stability of emulsions

Entry	Emulsifier amount (g)	Water amount (g)	Co-solvent amount	Initial emulsion state	Transparency (% transmittance)	Phase stability after centrifugation
1	Tween 80 (10 g)	79.8	-	Single phase	91.2	96
2	Tween 80 (10 g)	77.8	PG (2g)	Single phase	93.3	98
3	Tween 80 (10 g)	77.8	Glys. (2g)	Single phase	91.8	97
4	Gum arabic (10 g)	79.8	-	Single phase	7.5	26
5	Gum arabic (5 g)	84.8	-	Single phase	11	14
6	Gum arabic (5 g) + Tween 80 (5 g)	79.8	-	Single phase	12	16
7	Lecithin (5 g)	84.8	-	Two phase	-	-
8	Lecithin (3 g)	87.8	-	Two phase	-	-

Entry	Emulsifier amount (g)	Water amount (g)	Co-solvent amount	Initial emulsion state	Transparency (% transmittance)	Phase stability after centrifugation
9	Whey protein non-isolate (5 g)	84.8	-	Two phase	-	-
10	Starch-OSA (5 g)	84.8	-	Two phase	-	-
11	Starch-OSA (10 g)	79.8	-	Two phase	-	-
12	Starch-OSA (5 g) + Tween 80 (2 g)	82.8	-	Two phase	-	-
13	Starch-OSA (2.5 g) + Tween 80 (2 g)	85.3	-	Two phase	-	-
14	Brij35 (2.5 g)	87.3	-	Two phase	-	-
15	Brij35 (5 g)	84.8	-	Two phase	-	-
16	Brij35 (10 g)	79.8	-	Two phase	-	-
17	Brij35 (2.5 g) + Tween 80 (1 g)	86.3	-	Two phase	-	-
18	Tween 80 (1 g)	79.8	PG (9 g)	Single phase	14	54
19	Tween 80 (1 g)	79.8	PEG-400 (9 g)	Single phase	12	49
20	Tween 80 (1 g)	79.8	Gly. (9 g)	Single phase	11	48
21	Gum arabic (2.6 g) + Xanthan (0.1 g)	85.91	-	Single phase	8	20
22	Gum arabic (2 g) + Xanthan (0.7 g)	85.91	-	Single phase viscous	7	15
23	Tween 80 (0.8 g)	80	PG (9 g)	Single phase	8	22
24	Tween 80 (0.7 g)	80.1	PG (9 g)	Single phase	8	20
25	Gum arabic (2 g) + Xanthan (0.7 g) + Tween 80 (0.2 g)	85.71	-	Single phase viscous	7	14
26	Gum arabic (5 g) + Xanthan (0.1 g) + Tween 80 (0.2 g)	83.31	-	Single phase	10	19

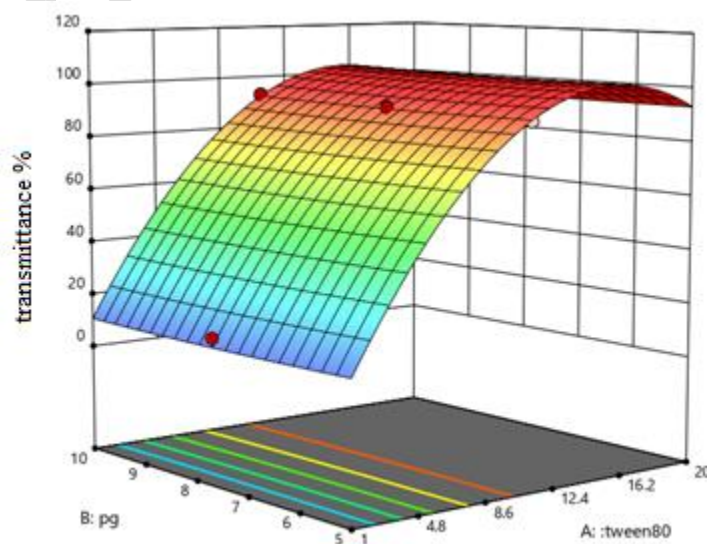
Entry	Emulsifier amount (g)	Water amount (g)	Co-solvent amount	Initial emulsion state	Transparency (% transmittance)	Phase stability after centrifugation
27	Span 20 (1 g)	79.8	PG (9 g)	Single phase	21	35
28	Span 20 (5 g)	75.8	PG (9 g)	Single phase	29	46

Note: Ultrasonication conditions were constant for all tests: time (2 min), power 90% (360 W). All tests were performed using 4% saffron essential oil.



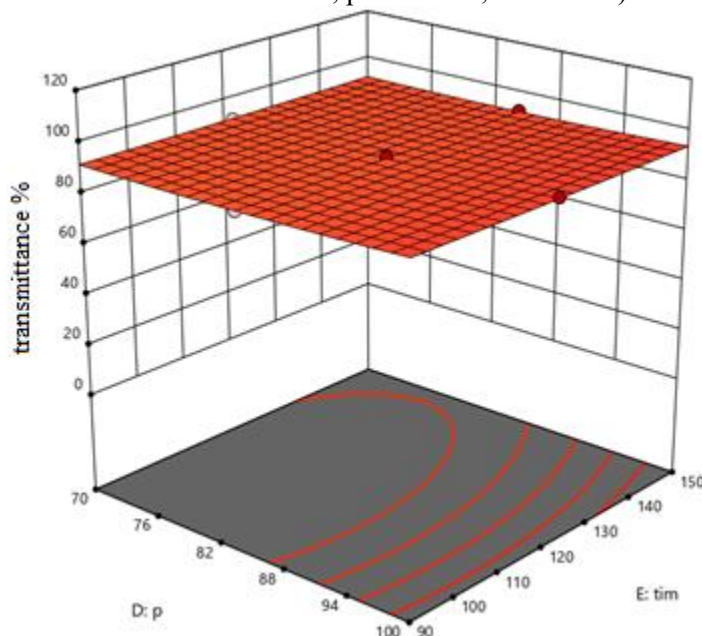
شکل ۱: حالت فیزیکی امولسیون های تهیه شده با امولسیفایرهای مختلف (۱: تویین ۸۰، ۲: صمغ عربی+تویین ۸۰، ۳: صمغ عربی، ۴: صمغ عربی + زانتان، ۵: لسیتین، ۶: whey protein، ۷: بrij ۳۵، ۸: Starch-OSA)

Figure 1. Physical state of emulsions prepared with different emulsifiers (1: Tween 80, 2: Gum arabic + Tween 80, 3: Gum arabic, 4: Gum arabic + Xanthan, 5: Lecithin, 6: Whey protein, 7: Brij35, 8: Starch-OSA)



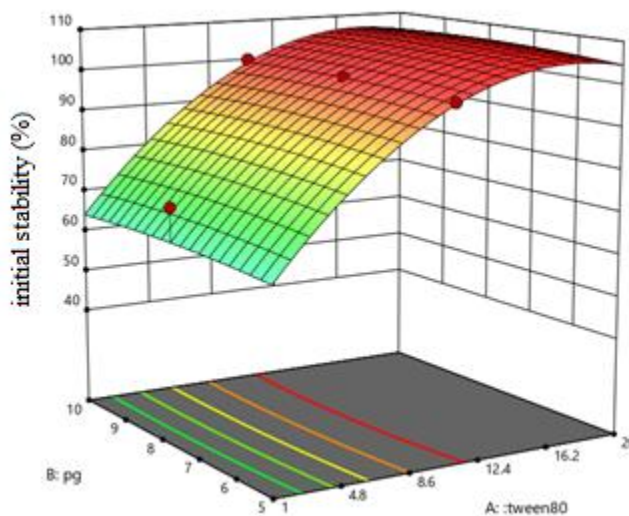
شکل ۲: نمودار سطح پاسخ (3D Surface) و خطوط تراز (Contour Plot) اثر متقابل غلظت توپین ۸۰ (A) و پروپیلن گلیکول (B) بر درصد عبور نور نانوامولسیون زعفران (در شرایط ثابت: اسانس ۴٪، توان ۸۵٪، زمان ۱۰۵ ثانیه)

Figure 2. Response surface plot (3D Surface) and contour plot showing the interactive effect of Tween 80 concentration (A) and propylene glycol concentration (B) on the percent transmittance of saffron nanoemulsion (constant conditions: essential oil 4%, power 85%, time 105 s)



شکل ۳: نمودار سطح پاسخ (3D Surface) و خطوط تراز (Contour Plot) اثر متقابل زمان (E) و توان (D) اولتراسونیک بر درصد عبور نور نانوامولسیون زعفران (در شرایط ثابت: توپین ۸۰ ۱۰.۵٪، پروپیلن گلیکول ۷.۵٪، اسانس ۴٪)

Figure 3. Response surface plot (3D Surface) and contour plot showing the interactive effect of ultrasonication time (E) and power (D) on the percent transmittance of saffron nanoemulsion (constant conditions: Tween 80 10.5%, propylene glycol 7.5%, essential oil 4%)



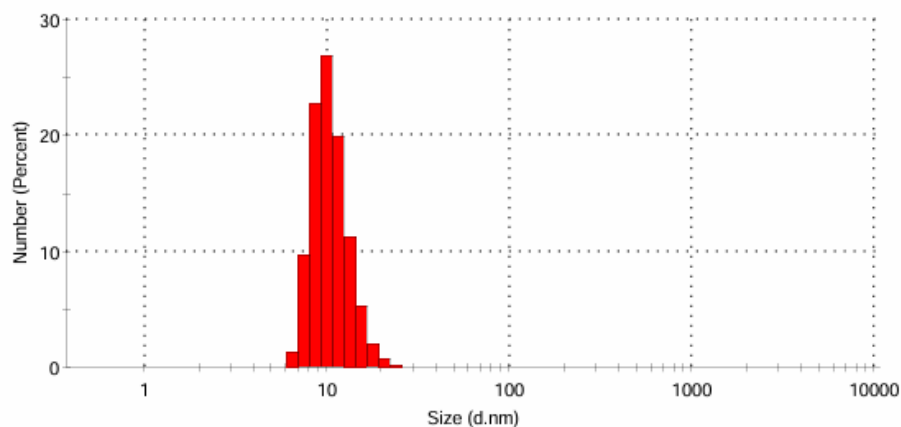
شکل ۴: نمودار سطح پاسخ (3D Surface) و خطوط تراز (Contour Plot) اثر متقابل غلظت توپین ۸۰ (A) و پروپیلن گلیکول (B) بر پایداری اولیه (نانوامولسیون زعفران (در شرایط ثابت: اسانس ۴٪، توان ۸۵٪، زمان ۱۲۰ ثانیه)

Figure 4. Response surface plot (3D Surface) and contour plot showing the interactive effect of Tween 80 concentration (A) and propylene glycol concentration (B) on the initial stability (%) of saffron nanoemulsion (constant conditions: essential oil 4%, power 85%, time 120 s)



شکل ۵: اسانس زعفران پایه استفاده شده در مطالعه حاضر که بصورت نامحلول در آب است و دوفازی می شود (سمت راست) و امولسیون زعفران شفاف، تک فازی و پایدار تهیه شده از همان اسانس زعفران (سمت چپ)

Figure 5. The saffron essential oil used in the present study showing insolubility in water and two-phase formation (right), and the transparent, single-phase, stable saffron emulsion prepared from the same saffron essential oil (left)



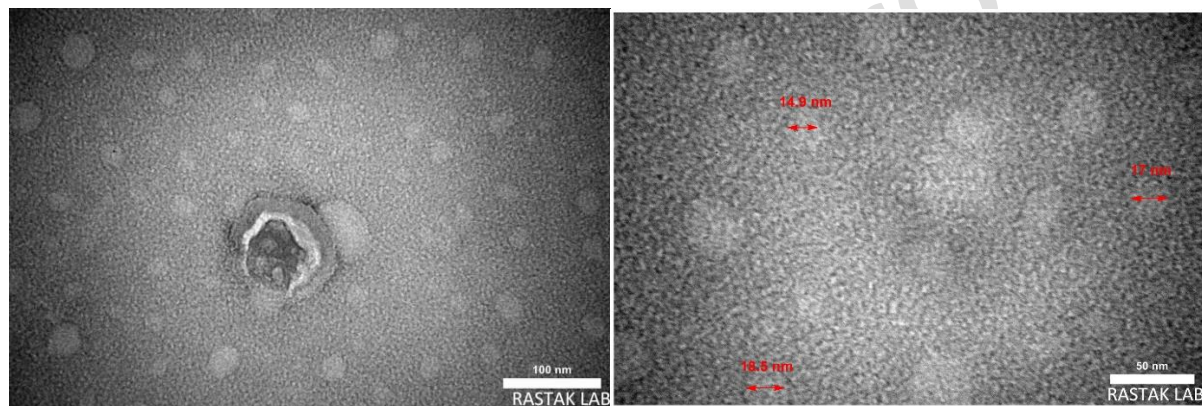
شکل ۶: آنالیز DLS نمونه امولسیونی زعفران نهایی

Figure 6. DLS analysis of the final saffron emulsion sample

Type	Start Date/Time	Sample ID	Zeta Potential (mV)	Mobility ($\mu\text{s}/(\text{V}/\text{cm})$)	Conductance (μS)	Sample Count Rate (kcps)	Ref. Count Rate (kcps)	RMS Residual
PALS	09/17/2024 12:51:13 ق.ق.	Zamanian - 1	47.14-	3.68-	126	595	838	3.9336e-02
PALS	09/17/2024 12:51:50 ق.ق.	Zamanian - 2	44.01-	3.44-	126	595	838	4.4832e-02
PALS	09/17/2024 12:52:26 ق.ق.	Zamanian - 3	47.59-	3.72-	126	595	838	2.7009e-02
PALS	09/17/2024 12:53:02 ق.ق.	Zamanian - 4	44.50-	3.48-	126	595	838	2.4214e-02
PALS	09/17/2024 12:53:39 ق.ق.	Zamanian - 5	43.49-	3.40-	126	595	838	2.8126e-02
PALS	09/17/2024 12:54:15 ق.ق.	Zamanian - 6	43.54-	3.40-	126	595	838	1.4893e-02
PALS	09/17/2024 12:54:51 ق.ق.	Zamanian - 7	45.97-	3.59-	126	595	838	2.7231e-02
Mean:			45.18-	3.53-	126	595	838	2.9377e-02
Std Err:			0.65	0.05	0	0	0	3.7361e-03
Std Dev:			1.72	0.13	0	0	0	9.8848e-03

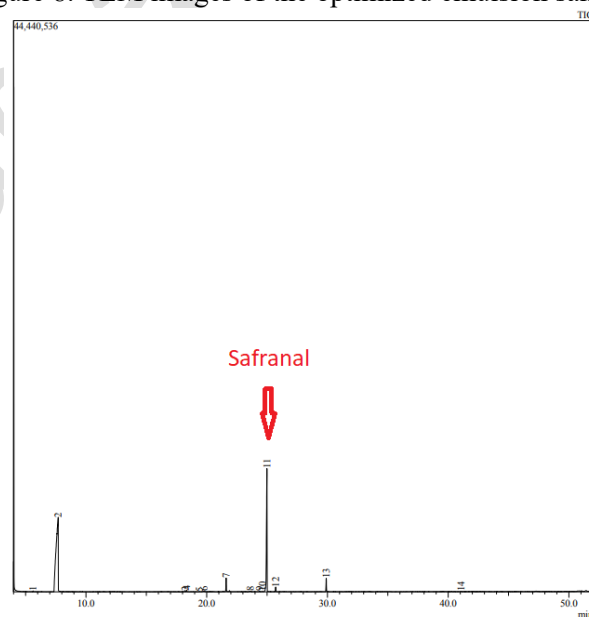
شکل ۷: آنالیز پتانسیل زتا از نمونه امولسیون زعفران نهایی

Figure 7. Zeta potential analysis of the final saffron emulsion sample



شکل ۸: تصاویر TEM نمونه امولسیون بهینه شده

Figure 8. TEM images of the optimized emulsion sample



شکل ۹: آنالیز GCMS نمونه امولسیون زعفران نهایی

Figure 9. GC-MS analysis of the final saffron emulsion sample

جدول ۲: مقایسه ارزیابی حسی اسانس های غیرامولسیون و امولسیون زعفران بلافاصله پس از تهیه

Table 2. Comparison of sensory evaluation of non-emulsified and emulsified saffron essential oils immediately after preparation

Sample name	Odor desirability	Taste desirability	Overall desirability
Emulsified	4.9±0.1a	4.9±0.1a	4.9±0.1a
Non-emulsified	4.8±0.2a	4.8±0.1a	4.8±0.2a

Note: 5 is the highest and 1 is the lowest desirability.

جدول ۳: مقایسه ارزیابی حسی اسانس های غیرامولسیون و امولسیون زعفران در نوشیدنی

Table 3. Comparison of sensory evaluation of non-emulsified and emulsified saffron essential oils in beverage

Sample name	Odor desirability	Taste desirability	Overall desirability
Emulsified	4.9±0.1a	4.9±0.1a	4.9±0.1a
Non-emulsified	4.8±0.2a	4.8±0.1a	4.8±0.2a

Note: 5 is the highest and 1 is the lowest desirability.

جدول ۴: ارزیابی خواص فیزیکی و میزان پایداری نمونه نانوامولسیون پس از تست های پایداری

Table 4. Evaluation of physical properties and stability of nanoemulsion sample after stability tests

Stability test type	Appearance	Stability (%)	Transmittance (% transparency)
Initial sample	Clear yellow liquid	100	93.1
Sample after 1 week at 45°C	Clear yellow liquid (no change)	100	92.8
Sample after 2 weeks at 45°C	Clear yellow liquid (no change)	100	92.9
Sample after 3 weeks at 45°C	Clear yellow liquid (no change)	100	93.5
Sample after 4 weeks at 45°C	Clear yellow liquid (no change)	100	92.5
Pasteurized sample (75°C, 15 min)	Clear yellow liquid (no change)	100	92.2

Note: Stability was measured after centrifugation at 10,000 rpm for 30 minutes. Transmittance was measured using a UV-Vis spectrophotometer.

جدول ۵: ارزیابی خواص فیزیکی و میزان پایداری نمونه نانوامولسیون در برابر انجماد، PH و قدرت یونی

Table 5. Evaluation of physical properties and stability of nanoemulsion sample against freeze-thaw, pH, and ionic strength

Stability test type	Appearance	Stability (%)	Transmittance (% transparency)
Initial sample	Clear yellow liquid	100	93.1

Stability test type	Appearance	Stability (%)	Transmittance (% transparency)
Freeze-thaw stability (-18°C)	Clear yellow liquid (no change)	100	92.3
pH stability (pH 2)	Clear yellow liquid (no change)	100	92.7
pH stability (pH 9)	Clear yellow liquid (no change)	100	92.6
Ionic strength stability (NaCl)	Clear yellow liquid (no change)	100	93.1

Note: Stability was measured after centrifugation at 10,000 rpm for 30 minutes. Transmittance was measured using a UV-Vis spectrophotometer.

جدول ۶: مقایسه خواص شیمیایی و ارزیابی حسی نمونه نانوامولسیون و نمونه غیرامولسیون پس از تست های پایداری
Table 6. Comparison of chemical properties and sensory evaluation of nanoemulsion and non-emulsified samples after stability tests

Sample type	Stability test type	Safranal peak area (%)	Taste desirability	Odor desirability	Overall desirability
Nanoemulsion sample ----- Non-emulsified sample	Initial sample	29.52 29.52	4.9±0.1 Aa 4.8±0.2 Aa	4.9±0.1 Aa 4.8±0.1 A	4.9±0.1 Aa 4.8±0.2 Aa
	Sample after 1 week at 45°C	29.49 23.55	4.9±0.1 Aa 4.4±0.1 Bc	4.9±0.1 Aa 4.5±0.3 Bc	4.9±0.1 Aa 4.4±0.5 Bc
	Sample after 2 weeks at 45°C	29.43 21.54	4.8±0.1 Aa 4.2±0.2 Bd	4.9±0.1 Aa 4.4±0.3 Bd	4.9±0.1 Aa 4.3±0.5 Bd
	Sample after 3 weeks at 45°C	29.41 20.15	4.9±0.1 Aa 4.1±0.2 Bd	4.8±0.1 Aa 4.0±0.3 Bd	4.9±0.1 Aa 4.0±0.5 Bd
	Sample after 4 weeks at 45°C	29.31 18.62	4.8±0.1 Aa 3.8±0.2 Be	4.8±0.1 Aa 3.6±0.3 Be	4.8±0.1 Aa 3.7±0.5 Be
	Pasteurized sample (75°C, 15 min)	29.26 14.90	4.8±0.1 Aa 3.1±0.2 Bf	4.8±0.1 Aa 3.0±0.3 Bf	4.8±0.1 Aa 3.0±0.5 Bf

Notes: In the table above, similar lowercase Latin letters indicate no significant difference of a characteristic over time. Similar uppercase Latin letters indicate no significant difference of a characteristic between the emulsion and non-emulsion samples. Safranal percentage was measured using GC-MS. 5 is the highest and 1 is the lowest desirability.

Food-Grade Saffron Nanoemulsion with Ultrafine Particles: Process and Formulation Optimization for Maximum Transparency and Stability

Fariborz Mansouri*¹, Akbar Mohammadi Zardkhoshoui*¹

¹Department of Chemical Technologies, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran

Corresponding Author Email: f.mansouri@irost.ir

Introduction: Saffron, known as the world's most expensive spice, is a valuable source of natural essential oil with unique aroma and flavor. The main volatile compound of saffron essential oil is safranal,

which is responsible for its distinctive odor. However, direct application of saffron essential oil in aqueous-based food products such as beverages faces significant challenges due to its lipophilic nature, poor water solubility, high volatility, and susceptibility to oxidation. Conventional methods for overcoming these limitations rely on organic solvents and fillers (e.g., triacetin, propylene glycol, vegetable oils), which increase production costs, reduce flavor intensity, and exhibit limited physicochemical stability over time. In recent years, nanoemulsion technology has emerged as a novel and efficient strategy to overcome these limitations. Nanoemulsions are heterogeneous colloidal systems with droplet sizes typically ranging from 20 to 200 nm, offering high kinetic stability, optical transparency, and enhanced bioavailability of lipophilic compounds. Among various high-energy emulsification methods, ultrasonication has gained significant attention due to its high efficiency in droplet size reduction, narrow size distribution, and relatively low energy consumption. The objective of this study was to design, formulate, and optimize a food-grade, water-based saffron essential oil nanoemulsion using response surface methodology (RSM), and to evaluate its physicochemical properties, stability, and sensory performance.

Nanoemulsion preparation: The aqueous phase containing modified starch (2-5%), xanthan gum (0.2-0.7%), sodium benzoate (0.2 g), and citric acid (0.39 g) was stirred for 30 min at 50-60°C to ensure complete hydration. The oil phase containing saffron essential oil (3-5%) and Tween 80 (0.5-1%) was prepared separately. The pre-emulsion was prepared using a magnetic stirrer at 700 rpm for 15 min. For the final nanoemulsion preparation, an ultrasonic processor (Misonix S-4000, USA, 20 kHz, 280-400 W) was used for 90-150 s. The temperature was controlled using a cooling circulator (Lauda RA 8, Germany) to prevent overheating.

Results and Discussion: The screening results demonstrated that formulations based on Tween 80 were significantly superior. The sample containing 10 g Tween 80 and 2 g propylene glycol (PG) exhibited the best performance with 93.3% transparency and 98% stability after centrifugation. This superiority is attributed to the high HLB of Tween 80 (~15), making it ideal for oil-in-water emulsion formation. PG, as a polar co-solvent, enhanced the solubility of lipophilic components in the aqueous phase and reduced interfacial tension, facilitating the formation of finer droplets. In contrast, natural emulsifiers such as gum arabic and modified starch showed poor transparency (7.5-12%) and stability (14-26%). Consequently, the combination of Tween 80 and propylene glycol was selected as the optimal emulsifier system for subsequent optimization.

The ANOVA results showed that the quadratic model was significant for both responses (p -value < 0.0001). The R^2 values for transparency and initial stability were 0.9977 and 0.9367, respectively, indicating excellent model fit. The lack-of-fit was not significant for both responses (p -value = 0.4468 and 0.0754, respectively), confirming model adequacy.

Effect on transparency: Tween 80 concentration (A) had the strongest effect on transparency (F-value = 15577.25, p < 0.0001). Increasing Tween 80 from 1% to 20% enhanced transparency from <10% to >95%. PG exhibited a positive synergistic effect with Tween 80; at high Tween 80 concentrations, increasing PG from 5% to 10% improved transparency from 90.3% to 95.6%. Ultrasonication power and time also showed positive effects. Maximum transparency was achieved at high power (400 W), adequate time (150 s), high Tween 80 concentration (20%), and moderate saffron oil concentration (4%).

Effect on stability: Tween 80 concentration had the strongest effect on initial stability (F-value = 526.49, p < 0.0001). At low Tween 80 concentrations (1%), stability was very low (45-65%), whereas increasing Tween 80 to 20% resulted in 100% stability. PG showed a positive complementary effect, increasing stability up to 100%. Optimal stability (100%) was achieved at high levels of both process parameters (400 W, 150 s) and high Tween 80 (20%) and PG (10%) concentrations.

Optimal conditions: Based on statistical analysis and considering economic efficiency, the optimal conditions were determined as: Tween 80 (10%), propylene glycol (9%), saffron essential oil (3.5%), ultrasonication power (360 W), and ultrasonication time (150 s). The optimal nanoemulsion exhibited a mean particle size of 14.7 nm, zeta potential of -45.18 mV, transparency of 93.1%, and initial stability of 100%. Achieving such a small particle size (below 50 nm) is a remarkable achievement, as most food emulsions are in the micrometer range. The zeta potential value indicates excellent electrostatic stability.

and resistance to flocculation. TEM images confirmed the formation of spherical droplets with uniform size distribution in the range of 15-20 nm, which is in good agreement with DLS results. No aggregation or coalescence was observed, consistent with the high zeta potential and physical stability. GC-MS analysis confirmed the preservation of 29.52% safranal in the final nanoemulsion. Sensory evaluation revealed that the nanoemulsion received significantly higher scores for odor, taste, and overall acceptability (4.9 ± 0.1 out of 5) compared to non-emulsified saffron essential oil (4.8 ± 0.2).

The optimized nanoemulsion maintained 100% physical stability and excellent transparency (92.2-93.5%) throughout 4 weeks of storage at 45°C and after pasteurization (75°C, 15 min). It also remained stable after a freeze-thaw cycle (-18°C, 24 h) and under extreme pH conditions (pH 2 and 9) as well as in the presence of NaCl (200 mM), maintaining 100% stability and desirable transparency (92.6-93.1%). Comparative stability studies (Table 5) showed a dramatic difference between the nanoemulsion and non-emulsified saffron oil. After 4 weeks at 45°C, safranal in the non-emulsified sample decreased from 29.54% to 18.62% (~37% loss), and sensory scores dropped below 3 out of 5. In contrast, the nanoemulsion maintained safranal at 29.31% and sensory scores remained in the range of 4.8-4.9 under identical conditions.

Conclusion: This study successfully developed and optimized a food-grade, water-based saffron essential oil nanoemulsion using response surface methodology. The optimal formulation consisted of 10% Tween 80, 9% propylene glycol, and 3.5% saffron essential oil, processed by ultrasonication at 360 W for 150 s. The resulting nanoemulsion exhibited exceptional characteristics: mean particle size of 14.7 nm, zeta potential of -45.18 mV, transparency of 93.1%, and 100% initial stability. TEM imaging confirmed spherical morphology with uniform size distribution (15-20 nm). The nanoemulsion showed outstanding physical stability under various environmental stresses including thermal treatment (4 weeks at 45°C and pasteurization), freeze-thaw cycles, extreme pH conditions (2 and 9), and ionic strength (200 mM NaCl). Sensory evaluation revealed significantly higher acceptability of the nanoemulsion compared to non-emulsified saffron oil. Furthermore, the nanoemulsion effectively protected safranal from thermal and oxidative degradation. This technology provides a practical and effective solution for delivering saffron flavor in clear beverages and other aqueous food products, offering improved shelf-life, enhanced sensory quality, and increased commercial value.

Keywords: Nanoemulsion, Saffron, Ultrasonication, Optimization, Stability, Sensory Evaluation