

مقاله پژوهشی

تأثیر حمام اولتراسونیک، نسبت سورفاکتانت به روغن و غلظت موسیلاژ دانه به بر ویژگی‌های نانوامولسیون خودبه‌خودی

رضا قادرمزی^{۱*}، اصغر خسروشاهی اصل^۲، محمدحسین عزیزی^۳، فردین تمجیدی^۴

۱. دانشجوی دکتری، علوم و صنایع غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

۲. استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

۳. استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

۴. استادیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان

(تاریخ دریافت: ۹۷/۱۱/۱، تاریخ آخرین بازنگری: ۹۸/۱/۱۲، تاریخ پذیرش: ۹۸/۴/۲۵)

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی ویژگی‌های نانوامولسیون روغن در آب تثبیت شده با مخلوط ایزوله پروتئین آب پنیری در غلظت ۱ w/v و موسیلاژ دانه به در غلظت ۰/۱٪ و ۰/۵ w/v به روش کم انرژی خودبه‌خودی و پر انرژی هموژنایزر فراصوت است. از آنجا که مشکل اصلی روش امولسیون‌سازی خودبه‌خودی استفاده از مقادیر بالای سورفاکتانت‌های سنتزی است، بنابراین یکی از اهداف این تحقیق بررسی تأثیر نسبت‌های مختلف سورفاکتانت به روغن در سه نسبت ۱:۱، ۲:۱ و ۳:۲ SOR و تیمار کمکی حمام اولتراسونیک روی ویژگی‌های نانوامولسیون خودبه‌خودی بود. پارامترهای اندازه ذرات، پتانسیل زتا، ویسکوزیته ظاهری و پایداری نانوامولسیون مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه امولسیون‌های با قطر ذرات کمتر از ۲۰۰ nm به‌خوبی تهیه شدند. افزایش غلظت موسیلاژ و نسبت سورفاکتانت به روغن باعث کاهش معنی‌دار اندازه ذرات، افزایش اندک پتانسیل زتا یعنی با افزایش نگاتیویته، افزایش ویسکوزیته، کاهش اندیس خامه‌ای شدن و افزایش شاخص پایداری امولسیون‌ها شد. نمونه‌های حاصل از روش پر انرژی و نمونه‌های که با حمام اولتراسونیک تیمار شده‌اند دارای کمترین اندازه ذرات و مقدار شاخص خامه‌ای شدن و بیشترین شاخص پایداری امولسیون بودند. نتایج این تحقیق نشان داد که می‌توان با یک تیمار ساده توسط حمام اولتراسونیک می‌توان نانوامولسیون خودبه‌خودی با ذرات بسیار کوچک در ابعاد نانومتر بدون نیاز به غلظت‌های بالای سورفاکتانت‌های سنتزی را تهیه کرد.

واژه‌های کلیدی: نانوامولسیون خودبه‌خودی، حمام اولتراسونیک، موسیلاژ دانه به، ایزوله پروتئین آب پنیر.

۱. مقدمه

استفاده از روش‌های کم انرژی در تشکیل امولسیون به دلیل داشتن فوایدی مثل سادگی، در دسترس بودن، هزینه پایین، عدم نیاز به تجهیزات خاص و گران قیمت مورد توجه قرار گرفته است؛ اما با این حال هنوز در مقیاس صنعتی تحقیقات چندانی صورت نگرفته است و نیازمند تحقیقات بیشتر است [۶، ۱۳].

روش‌های کم انرژی را می‌تواند به دو دسته روش‌های حرارتی و ایزوترمال هم‌دما طبقه‌بندی کرد. در روش‌های حرارتی تشکیل امولسیون به دلیل تغییرات در خواص سورفاکتانت با تغییر دما است که ساختار سیستم ثابت است، درحالی‌که روش‌های ایزوترمال تشکیل امولسیون به دلیل تغییرات در محل ترکیبات داخل سیستم در دمای ثابت است که در واقع تغییر ساختار سیستم است [۶]. امولسیون‌سازی غشایی، خودبه‌خودی، جانشین‌سازی حلال، معکوس شدن امولسیون و معکوس شدن فاز از جمله روش‌های مرسوم برای تولید نانوامولسیون‌ها با انرژی پایین هستند. روش‌های خودبه‌خودی و معکوس شدن فاز جزو دسته روش‌های ایزوترمال هستند [۱۴]. درحالی‌که معکوس شدن فاز با درجه حرارت یک روش حرارتی است [۱۵]. هرچند روش کم انرژی دارای مزیت‌های فراوانی است ولی نیاز به مقدار زیاد سورفاکتانت و لزوم انتخاب دقیق سورفاکتانت و کوسورفاکتانت محدودیت‌هایی را در استفاده از این روش ایجاد کرده‌اند که شاید بتوان به کمک یک سری تیمارها مقدار سورفاکتانت مصرفی را کاهش داد.

روش تولید نانوامولسیون خودبه‌خودی از طریق تیتراسیون یک فاز آلی حاوی یک مخلوط هموزن از روغن و سورفاکتانت هیدروفیل به فاز آبی است [۱]. زمانی که دو فاز در مجاورت هم قرار می‌گیرند، سورفاکتانت که در هر دو فاز قابل امتزاج است، به تدریج از فازی که در آن حضور داشت به فاز دیگر مهاجرت می‌کند. با مهاجرت این ترکیب، مساحت بین سطحی افزایش می‌یابد، آشفتگی بین سطحی ایجاد می‌شود و در نهایت امولسیون تشکیل می‌شود. می‌توان با تغییر دادن شرایط هم زدن و نوع فازهایی که برای تولید امولسیون از آن‌ها استفاده شده است، اندازه قطره‌ها را کنترل نمود [۱۶]. علاوه بر آشفتگی بین سطحی سایر مکانیسم‌ها مانند انتشار مواد موجود در محلول بین دو فاز، گرادیان کشش سطحی، مکانیسم پراکنندگی و مکانیسم کندانس شدن ممکن است در تشکیل نانوامولسیون خودبه‌خودی شرکت کنند [۱۷]. نوع سورفاکتانت و روغن مورد استفاده برای تشکیل

نانوامولسیون‌ها دسته‌ای از امولسیون‌ها هستند با قطر ذرات ۲۰ تا ۲۰۰ nm که در مقایسه با امولسیون‌های معمولی دارای مزایای بالقوه‌ای برای کاربردهای خاص در مواد غذایی و نوشیدنی هستند [۱]. نانوامولسیون‌ها به‌طور معمول ثبات بهتری در مقابل تجمع ذرات و جداسازی گرانشی دارند [۲]. از آنجا که ذرات موجود در نانوامولسیون‌ها بسیار کوچک هستند، امواج نور را به مقدار کمی پراکنده می‌کنند، بنابراین برای محصولاتی که نیاز به ظاهری روشن یا کدورت پایین دارند مانند نوشیدنی‌های بدون الکل و آب، برخی سوپ‌ها، سس‌ها و کره مناسب هستند [۳، ۴]. نانوامولسیون‌ها دارای نسبت سطح به حجم بزرگ‌تری نسبت به امولسیون‌های معمولی دارند، بنابراین پدیده‌های مربوط به تغییر شکل قطره‌ها، مانند فشار لاپلاس و مدول الاستیک، به‌طور معمول برای نانوامولسیون‌ها از امولسیون‌های معمولی بیشتر است [۵].

نانوامولسیون‌ها را می‌توان با استفاده از هر دو روش پر انرژی و کم انرژی تهیه کرد. در روش پر انرژی از تجهیزات تخصصی مانند هموژنایزرها، آسیاب‌های کلونیدی، همگن‌سازهای با سرعت یا فشار بالا و همگن‌سازهای فراصوت استفاده می‌کنند که به‌وسیله تولید نیروهای شدید مکانیکی باعث ریزتر شدن ذرات و ترکیب شدن روغن و آب می‌شوند [۸-۶]. روش پر انرژی، به دلیل کنترل توزیع اندازه قطرات امولسیون و قابلیت تولید امولسیون‌هایی مناسب و با تنوع زیاد، قابلیت کاربرد صنعتی بیشتری در صنایع غذایی دارد [۷]. متغیرهای اصلی که ویژگی‌های نانوامولسیون را با استفاده از روش پر انرژی تحت تأثیر قرار می‌دهند، عبارت‌اند از شدت انرژی و مدت‌زمان، نوع و غلظت سورفاکتانت و خواص فیزیکی و شیمیایی فازهای روغن و آب استفاده‌شده [۹]. البته باید به این نکته نیز توجه کرد که استفاده از حمام التراسوند نسبت به پروب اولتراسونیک دارای شدت انرژی کمتری است و بنابراین اندازه ذرات حاصله از آن نیز بزرگتر است ولی این مزیت را دارد که می‌تواند برای مقیاس‌های بالاتر مورد استفاده قرار گیرد [۱۰]. اگرچه امواج فراصوت یک تکنیک مفید برای کمک به پراکنندگی و تثبیت نانوسیال‌ها هست، اما اثر نوع سیستم اولتراسوند (پروب یا حمام) بر روی مکانیسم سنتز نانوسیال به اثبات نرسیده است [۱۱]. در مقابل روش‌های پر انرژی، روش‌های کم انرژی مبتنی بر تشکیل خودبه‌خود امولسیون بر اساس رفتار فازی برخی از سورفاکتانت‌ها، روغن و آب هستند [۱۲]. به‌تازگی

نسبت به کاهش pH، وجود یون‌ها و دمای بالا مانع فلوکولاسیون می‌شود. آن‌ها دلیل این تفاوت را به مکانیسم پایدارکنندگی این امولسیفایرها نسبت داده‌اند که صمغ از طریق ممانعت فضایی و پروتئین از طریق دافعه الکترواستاتیکی این کار را انجام می‌دهند [۲۱]. شمسارا و همکاران در بررسی اثر فرایند اولتراسونیک، تیمار حرارتی و نسبت‌های مختلف صمغ زردآلو/لاکتوگلوبولین بر پایداری امولسیون گزارش کردند که تیمار اولتراسونیک به شکل معنی‌داری باعث افزایش پایداری امولسیون می‌شود، همچنین آن‌ها بهترین شرایط دمایی و pH برای پایداری امولسیون را به ترتیب در ۵۰ و ۳°C گزارش کردند [۲۲]. کالتسا و همکاران در بررسی اثر صمغ‌های زانتان، گوار و لوبیای خرنوب گزارش کردند که در غلظت‌های پایین صمغ به علت پدیده فلوکولاسیون امولسیون ناپایدار می‌شود [۲۳].

با وجود تحقیقات صورت گرفته، تاکنون مطالعه‌ای در زمینه اثر هم‌زمان موسیلاژ دانه به و ایزوله پروتئین آب پنیر در پایداری امولسیون‌های روغن در آب انجام نشده است؛ بنابراین هدف از این مطالعه استفاده از دو بیوپلیمر ایزوله پروتئین آب پنیر و موسیلاژ دانه به در ساخت نانوامولسیون به روش‌های کم انرژی خودبه‌خودی، پراثرژی هموژنایزر فراصوت و ترکیب روش خودبه‌خودی با حمام اولتراسونیک می‌باشد.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. مواد

دانه به از یک سوپرمارکت محلی در استان آذربایجان غربی شهرستان ارومیه خریداری شد. ایزوله پروتئین آب پنیر با بیش از ۹۰٪ پروتئین از شرکت آرلای دانمارک تهیه شد. روغن میگلیول ۸۱۲ از شرکت داروسازی زهراوی تبریز تهیه شد. اسید هیدروکلریک و سدیم هیدروکسید از شرکت مرک آلمان تهیه شد. سدیم آزید از شرکت کوالیکم هند خریداری شد. تمامی مواد دارای درجه آزمایشگاهی بودند. در تمامی آزمایش‌ها از آب دیونیزه برای تهیه نمونه‌ها استفاده شد.

۲.۲. استخراج موسیلاژ دانه به

استخراج موسیلاژ از دانه به طبق روش عباس‌تبار و همکاران [۲۴] همراه با کمی تغییر انجام شد. یک گرم از دانه‌های تمیز و فاقد پالپ به ۱۰۰g آب دیونیزه اضافه و دو ساعت در دمای ۶۰°C

نانوامولسیون خودبه‌خودی اهمیت فراوانی دارند. سورفاکتانت باید توانایی حرکت از فاز روغنی به فاز آبی هنگامی که این دو در تماس هستند را داشته باشد [۶]. در تحقیقات مختلف سورفاکتانت غیر یونی توپین ۸۰ به‌عنوان بهترین سورفاکتانت برای تشکیل نانوامولسیون خودبه‌خودی معرفی شده است به‌نحوی که با کمترین غلظت نسبت به سایر سورفاکتانت‌ها مانند توپین ۲۰ و ۶۰ قادر به تولید ذرات ریزتری است بنابراین در این تحقیق توپین ۸۰ انتخاب شد. نوع روغن مورد استفاده در فاز آلی نیز تأثیر مستقیمی در اندازه ذرات امولسیون نهایی دارد. روغن میگلیول ۸۱۲ در ساخت نانوامولسیون خودبه‌خودی نسبت به روغن‌های معطر مانند روغن معطر لیمو و پرتقال و انواع بلند زنجیر مانند روغن سویا و آفتابگردان توانایی بیشتری در تولید ذرات با ابعاد ریزتر را دارد. این امر ممکن است به دلیل ویژگی‌های این روغن مانند ویسکوزیته، چگالی یا کشش بین سطحی خاص آن باشد که به تشکیل خودبه‌خودی قطرات روغن در مرز فاز آلی/ فاز آبی منجر می‌شود [۱]. روغن میگلیول ۸۱۲ مایعی بی‌رنگ مایل به زرد روشن و متوسط زنجیر است که از روغن نارگیل استخراج می‌شود. در طی نگهداری تجزیه نمی‌شود و هیچ واکنش خطرناکی هم برای آن معرفی نشده است [۱۷] بنابراین برای مصرف در صنایع غذایی بی‌خطر است.

به با نام علمی *Cydonia oblonga*، بیشتر در خاورمیانه و در ایران نیز در مناطق شمال غربی کاشته می‌شود. روی دانه‌های به پوشیده از یک ماده موسیلاژی است که پس از مجاورت با آب از سلول‌های اپیدرم پوششی دانه به‌راحتی استخراج می‌شود و یک محلول لزج و بی‌مزه را می‌سازد [۱۸]. موسیلاژ دانه به توانایی تشکیل توده‌های پیچیده یا همان کمپلکس کواسرواسیون از طریق واکنش‌های الکترواستاتیکی در pH کمتر از نقطه ایزوالکتریک پروتئین را نیز دارد [۱۹] که می‌تواند در انکپسولاسیون ترکیبات غذا-دارو به‌کار رود. ایزوله پروتئین آب پنیر به دلیل خواص منحصربه‌فرد ژله‌ای شدن، امولسیفایری، کف‌کنندگی و پایدارکنندگی یکی از مهم‌ترین پروتئین‌های مورد استفاده در بسیاری از فرمولاسیون‌های غذایی مانند محصولات لبنی، گوشتی و نانوبی است [۲۰]. اوزتورک و همکاران گزارش کرده‌اند که نانوامولسیون پایدار شده توسط ایزوله پروتئین آب پنیر نسبت به صمغ عربی دارای اندازه ذرات کوچکتری هست ولی نانوامولسیون پایدار شده توسط صمغ عربی

۴.۲. آماده‌سازی نانوامولسیون‌ها

نانوامولسیون روغن در آب به روش خودبه‌خودی مطابق روش مک‌کلمنت و همکاران [۲۵] با کمی تغییر تهیه شد. برای تهیه فاز آبی، مقدار برابری از محلول (w/v) ۱٪ WPI با دو غلظت مختلف ۰/۱ و ۰/۵ (w/v) از محلول QSM کاملاً مخلوط شد. برای تهیه فاز آلی، روغن میگلیول با تویین ۸۰ که نسبت سورفاکتانت به روغن (SOR): ۱:۱، ۲:۳ و ۱:۲ بود توسط همزن مغناطیسی به مدت ۶۰ min در دمای محیط کاملاً مخلوط شد. در نهایت برای تهیه نانوامولسیون خودبه‌خودی، ۱۰ g از فاز آلی به آرامی و قطره قطره به ۹۰ g فاز آبی در حین همزدن مداوم با دور ۷۰۰ rpm در دمای محیط اضافه شد. کل زمان افزودن فاز آلی و زمان اضافه برای همزدن حدود ۳۰ min بود (نمونه‌های ۲، ۳، ۴، ۵، ۶ و ۷ در جدول ۱). امولسیون‌های به‌دست‌آمده تا زمان استفاده برای انجام آزمایش‌ها در شیشه‌های تیره‌رنگ داخل یخچال با دمای ۴ °C نگهداری شدند. یک نمونه بدون QSM نیز به‌عنوان شاهد تهیه گردید (نمونه ۱).

برای بررسی تأثیر امواج اولتراسونیک بعد از تهیه نانوامولسیون خودبه‌خودی، نمونه‌ها به مدت ۳۰ min دقیقه داخل حمام

توسط همزن مغناطیسی مخلوط شدند. برای اطمینان از استخراج کامل موسیلاژ از دانه‌ها، مخلوط به مدت ۱۲ h در دمای ۲۸±۲ °C نگهداری شد. برای صاف کردن و جداسازی دانه‌ها از پارچه کتان تمیز استفاده شد. در نهایت موسیلاژ در دمای ۵۰ °C توسط آون مجهز به سیرکولاتور هوا بعد از ۲۴ h خشک شد. موسیلاژ حاصل توسط هاون دستی کاملاً پودر شده و تا زمان استفاده در کیسه‌های پلاستیکی برای جلوگیری از تبادل هوا با بیرون و جذب رطوبت نگهداری شدند.

۳.۲. آماده‌سازی محلول‌های استوک موسیلاژ دانه به (QSM) و ایزوله پروتئین آب پنیر (WPI)

محلول‌های (w/v) ۱٪ پلیمرهای WPI و QSM هرکدام به صورت جداگانه آماده شدند. مخلوط‌ها ۲ h در دمای اتاق هم زده و به‌منظور آگیری کامل پلیمرها، محلول‌ها به مدت ۲۴ h در دمای ۴ °C نگهداری شدند. به هرکدام از محلول‌ها ۰/۰۲٪ سدیم آزید به‌عنوان عامل جلوگیری کننده از رشد میکروب‌ها اضافه شد. در صورت نیاز برای تنظیم pH=۷ از HCl و ۰/۱M NaOH استفاده شد.

جدول (۱) فرمولاسیون نانوامولسیون‌های مختلف.

Table (1) Formulation of different nanoemulsions.

هموزنایزر فراصوت Ultrasound homogenizer	حمام اولتراسونیک Bath-sonicator	نسبت سورفاکتانت به روغن SOR	تویین ۸۰* Tween 80 (g)	موسیلاژ دانه به %QSM	ایزوله پروتئین آب پنیر %WPI	نمونه Sample
-	-	1:1	5	0	1	1 (شاهد) (Control)
-	-	1:1	5	0.1	1	2
-	-	3:2	6	0.1	1	3
-	-	2:1	6.67	0.1	1	4
-	-	1:1	5	0.5	1	5
-	-	3:2	6	0.5	1	6
-	-	2:1	6.67	0.5	1	7
-	✓	1:1	5	0.5	1	8
-	✓	2:1	6.67	0.5	1	9
✓	-	1:1	5	0.5	1	10
✓	-	2:1	6.67	0.5	1	11

* g سورفاکتانت در ۱۰ g فاز آلی (فاز آلی = روغن + سورفاکتانت)

* g of surfactant in 10g of organic phase (organic phase= surfactant + oil)

۷.۲. بررسی پایداری نانوامولسیون‌ها

۱.۷.۲. سنجش میزان خامه‌ای شدن نانوامولسیون‌ها

پایداری نمونه‌های امولسیون از طریق مشاهده ظاهری آن‌ها اندازه‌گیری شد، بدین ترتیب پس از آماده‌سازی، نمونه‌ها در داخل لوله آزمایش ریخته شده و پس از بستن درب آن‌ها در دمای 5°C به مدت یک ماه نگهداری شدند. تعیین شاخص خامه‌ای شدن نمونه‌ها در حضور پروتئین سرمی بر اساس فاز سرمی جدا شده بر اساس رابطه (۱) محاسبه شد.

$$CI = \frac{HS}{HE} \times 100 \quad (1)$$

در این فرمول CI اندیس خامه‌ای شدن، HS ارتفاع سرم و HE ارتفاع کل امولسیون است.

۲.۷.۲. اندازه‌گیری خاصیت امولسیون کنندگی نانوامولسیون‌ها

برای این منظور، بلافاصله پس از تهیه نانوامولسیون، 10 mL از نمونه‌ها با دور 2555 g به مدت 5 min و دمای 25°C سانتریفیوژ گردیدند سپس بر اساس حجم فازهای جدا شده، شاخص خاصیت امولسیون کنندگی با استفاده از معادله (۲) اندازه‌گیری شد.

$$ESI = \frac{V_f}{V_i} \times 100 \quad (2)$$

در اینجا ESI شاخص خاصیت امولسیون کنندگی V_f حجم فاز بالایی امولسیون بعد از سانتریفیوژ و V_i حجم اولیه امولسیون است.

۸.۲. روش‌های تجزیه و تحلیل آماری

آزمون‌های بر اساس طرح کاملاً تصادفی با ۲ و ۳ تکرار انجام پذیرفت. برای تحلیل داده‌ها از آزمون مقایسه‌ی دانکن در سطح احتمال ۹۵٪ استفاده شد. محاسبات با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS ۲۵ انجام شد و نمودارها توسط نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۳ رسم شد. نتایج به صورت میانگین داده‌ها \pm انحراف استاندارد آن‌ها گزارش شدند. آزمایشات دارای ۱۱ تیمار مختلف بودند. اثر غلظت در دو سطح، اثر سورفاکتانت در سه سطح و اثر تیمارهای حمام و پروب اولتراسونیک نیز در دو سطح مختلف سورفاکتانت مورد بررسی قرار گرفت.

اولتراسونیک با دمای 30°C قرار گرفتند (نمونه‌های ۸ و ۹). همچنین برای مشاهده تأثیر هموژنایزر فراصوت ابتدا فاز آلی و فاز آبی با استفاده از همزن مغناطیسی به مدت 10 min دقیقه مخلوط شدند، سپس برای ریزتر شدن اندازه ذرات این امولسیون اولیه از هموژنایزر فراصوت Misonix sonicator مدل ۴۰۰۰، ساخت آمریکا، دمای 30°C ، زمان 10 min استفاده شد. هموژنایزر فراصوت دارای پروب با ضخامت 19 mm از نوع High gain horns، توان اسمی 600 W و بسامد 36 KHz بود. از آنجائی که در طی اعمال امواج فراصوت دمای مخلوط به دلیل تولید انرژی افزایش می‌یابد لذا به منظور کنترل و تثبیت دمای مخلوط از مخلوط آب و یخ استفاده شد (نمونه‌های ۱۰ و ۱۱). در نهایت تمام تیمارها با استفاده از هیدروکسید سدیم و اسیدکلریدریک 0.1 M در pH برابر ۷ تنظیم شد. همچنین نمونه‌های امولسیون قبل از آنالیز به مدت ۱۲ ساعت در دمای $4-7^{\circ}\text{C}$ نگهداری شدند.

۵.۲. آنالیز اندازه ذرات و پتانسیل زتای نانوامولسیون

برای تعیین اندازه ذرات (Z-Average)، شاخص توزیع اندازه ذرات (PDI) و بار الکتریکی سطحی ذرات در مقابل pH که به پتانسیل زتا (ζ) موسوم است از دستگاه زتاسایزر مدل Nano ZS، شرکت مالورن انگلستان استفاده شد. اندازه‌گیری‌ها یک روز بعد از تولید نمونه‌ها انجام شد. نتیجه آزمون در دمای 25°C به دست آمد. قبل از انجام این آزمایش، دیسپرسیون‌ها توسط آب دیونیزه تا نسبت ۱:۱۰۰ رقیق شدند.

۶.۲. اندازه‌گیری ویسکوزیته ظاهری

ویسکوزیته ظاهری نمونه‌ها توسط ویسکومتر چرخشی بروکفیلد مدل Brookfield-NDJ4 ساخت کشور چین در دمای محیط توسط پروب شماره ۱ با سرعت دورانی 60 rpm اندازه‌گیری شد. برای این کار 40 mL نمونه داخل ظرف مخصوص دستگاه ریخته شد و پروب به آرامی به طوری که با بدنه و کف برخورد نکند داخل نمونه غوطه‌ور شد. مقدار ویسکوزیته بعد از گذشت مدت زمانی حدود 30 s از چرخش پروب تا رسیدن به حالتی که عقربه روی یک عدد ثابت قرار بگیرد قرائت شد. مقدار ویسکوزیته برحسب $\text{mPa}\cdot\text{s}$ گزارش شد.

۳. نتایج و بحث

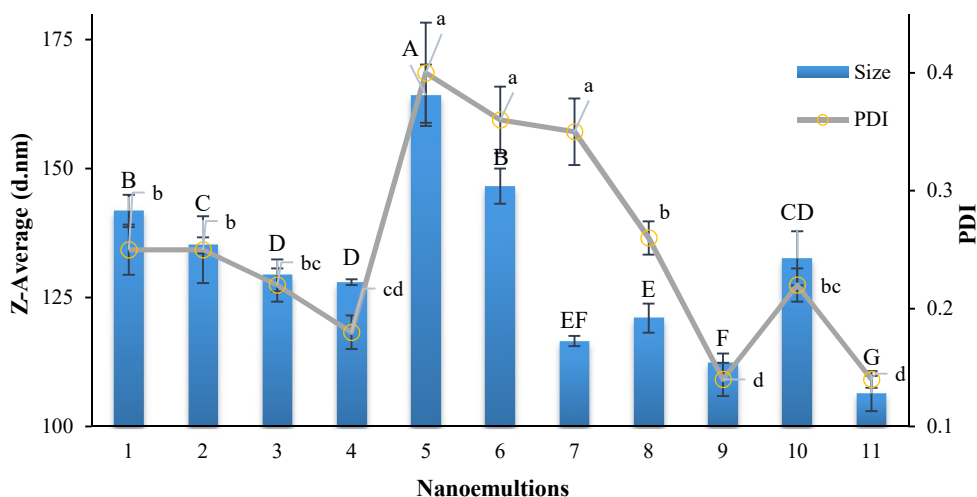
۱.۳. اثر غلظت سورفاکتانت (%SOR) بر اندازه ذرات،

توزیع اندازه ذرات (PDI) و پتانسیل زتا

برای بررسی تأثیر غلظت سورفاکتانت بر اندازه، PDI و پتانسیل زتای ذرات، سه نسبت مختلف از سورفاکتانت توپین ۸۰ به روغن میگلپول (۱:۱، ۳:۲ و ۲:۱ (SOR=)) مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱). به طور کلی با افزایش درصد سورفاکتانت‌های اندازه ذرات و PDI به شکل معنی داری ($p < 0.05$) کاهش یافت. البته در تمامی نمونه‌ها اندازه ذرات کمتر از ۲۰۰ nm بود. نتایج پراکندگی نور نشان داد که نانوامولسیون‌هایی که دارای سور بالا هستند توزیع اندازه ذرات باریکی دارند. پدیده‌های فیزیکی و شیمیایی مختلفی ممکن است در کاهش اندازه ذرات با افزایش غلظت سورفاکتانت دخیل باشند. سورفاکتانت‌ها به سطوح قطرات روغن جذب می‌شوند و به عنوان یک پوشش محافظ تجمع قطرات را مهار می‌کند [۲۶]. در واقع وقتی غلظت سورفاکتانت پایین باشد میزان ترکیب فعال سطحی مورد نیاز جهت پوشش دهی قطرات مهیا نبوده و بنابراین در اثر تجمع قطرات روغن، امولسیون با قطرات بزرگ‌تر از مقیاس نانو ایجاد خواهد شد [۲۷]. دلیل دیگر کاهش اندازه قطرات با افزایش غلظت سورفاکتانت را می‌توان به خاطر کاهش بیشتر کشش سطحی در مرز مشترک روغن با آب در نتیجه تعداد بالای مولکول‌های سورفاکتانت در سطح بیان نمود.

همچنین افزایش غلظت سورفاکتانت موجب می‌شود تا تعداد مولکول‌های بیشتری از سورفاکتانت از فاز روغنی به فاز آبی مهاجرت کنند و تولید قطرات ریز امولسیون آسان‌تر گردد [۱]. کومایکو و مک‌کلمنت گزارش کردند که نانوامولسیون خودبه‌خودی توسط سورفاکتانت توپین ۸۰ و روغن میگلپول به خوبی قابل ساخت است و با افزایش سور اندازه ذرات کاهش می‌یابد. البته اگر غلظت سورفاکتانت بیش از حد بالا باشد ممکن است اندازه ذرات افزایش یابد، این پدیده به دلیل تشکیل بلورهای مایعی مقاوم به تخریبی است که باعث کاهش امولسیون‌سازی خودبه‌خودی می‌شوند [۶]. البته در این تحقیق ما شاهد چنین اتفاقی نبودیم یعنی در غلظت‌های که مورد مطالعه قرار گرفتند افزایش اندازه ذرات با افزایش سورفاکتانت مشاهده نشد. مؤیدزاده و همکاران گزارش کردند که با افزایش سور در یک غلظت ثابت صمغ ژلان اندازه ذرات کاهش می‌یابد [۱۳].

شکل (۲) نتایج به دست آمده برای پتانسیل زتا نمونه‌های مختلف نانوامولسیون را نشان می‌دهد. با افزایش غلظت سورفاکتانت تغییرات پتانسیل زتا چندان مشهود نبود. به طوری که در غلظت ۰/۱٪ موسیلاژ، پتانسیل زتا با افزایش غلظت سورفاکتانت تغییری نشان نداد ($p > 0.05$) (نمونه‌ها ۲، ۳ و ۴). ولی در غلظت ۰/۵٪ موسیلاژ با افزایش غلظت سورفاکتانت، میزان پتانسیل زتا به میزان بسیار اندکی افزایش یافت، ولی این

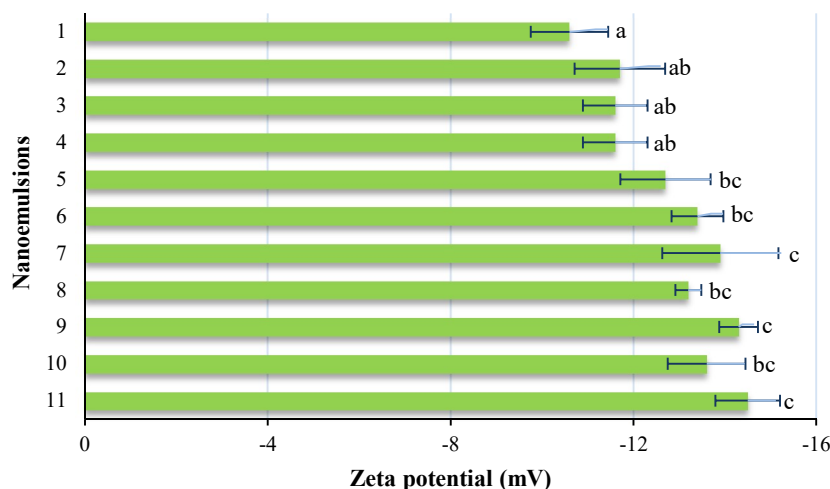


شکل (۱) اندازه ذرات (Z-Average, nm) و توزیع اندازه ذرات (PDI) نانوامولسیون‌ها

حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح $p < 0.05$ است (حروف بزرگ و کوچک به ترتیب مربوط به اندازه ذرات و PDI هستند)

Fig. 1. particle size (Z-Average, nm) and poly dispersity index (PDI) of nanoemulsions

Different superscript letters among bars denote significant difference ($p < 0.05$) (big and small letters related to the size and PDI, respectively).



شکل (۲) پروفایل پتانسیل زتا در نانوامولسیون‌ها در شرایط خنثی

حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح $p < 0.05$ است

Fig. 2. Zeta potential profiles of the nanoemulsions at neutral conditions
Different superscript letters among bars denote significant difference ($p < 0.05$)

ناسازگاری ترمودینامیکی بین این دو ترکیب است. همچنین گزارش شده است که پلی‌ساکاریدها از طریق نفوذ به فضای بین قطرات روغن با ایجاد ممانعت فضایی بر نیروی جاذبه وان-در-والس غلبه می‌کنند و مانع تجمع ذرات می‌شوند [۱۳، ۲۹]. البته با افزایش بیشتر موسیلاژ تا ۰/۵٪ (به جر نمونه ۷) در همان غلظت سورفاکتانت (۱:۱) اندازه ذرات افزایش معنی‌داری پیدا کرد به طوری که نمونه ۵ در بین تمام نمونه‌ها دارای بزرگترین اندازه ذرات بود. زو و همکاران بیان کردند که افزایش نسبت پکتین در مخلوط ایزوله پروتئین سویا-پکتین چغندر باعث افزایش اندازه ذرات امولسیون حاصل از آن شد و دلیل آن را به حضور پکتین جذب نشده در سطح ذرات روغن نسبت دادند که باعث تجمع نقصانی شده و اندازه ذرات را افزایش می‌دهد [۳۰]. نکته‌ای که در اینجا قابل توجه است این است که با افزایش غلظت سورفاکتانت برای غلظت‌های بالای موسیلاژ (نمونه ۷) اندازه ذرات به مقدار بسیار زیادی کاهش یافت که دلیل این امر احتمالاً مقدار بالای سورفاکتانت در این نمونه است که از طریق ممانعت فضایی بین زنجیره‌های پلیمرها مانع اتصال آن‌ها و در نتیجه مانع افزایش اندازه ذرات می‌شود. مؤیدزاده و همکاران نیز گزارش کرده‌اند که با افزایش غلظت صمغ ژلان اندازه ذرات کاهش می‌یابد که این نشان‌دهنده توانایی این صمغ در جلوگیری از انعقاد و بهم آمیختگی ذرات امولسیون هست [۱۳]. وانگ و همکاران در بررسی اثر صمغ بذر کتان بر خصوصیات امولسیون تهیه شده

افزایش به لحاظ آماری معنی‌دار نبود ($p > 0.05$) (نمونه‌های ۵ تا ۷). توجه شود که منظور از افزایش پتانسیل زتا در تمام متن منفی‌تر شدن مقدار آن است. در بین تیمارها نمونه شاهد (۱) که فاقد موسیلاژ بود کمترین پتانسیل زتا را داشت؛ بنابراین تغییر SOR در مقادیر به کار رفته در این تحقیق تأثیر چندانی در ویژگی‌های بار الکتریکی امولسیون‌ها ندارند. پرابهارکار و همکاران گزارش کردند که افزایش غلظت سورفاکتانت توپین ۸۰ در نانوامولسیون روغن در آب باعث افزایش بسیار اندکی در پتانسیل زتا می‌شود اما مقدار این تغییرات معنی‌دار نیست [۲۸].

۲.۳. اثر غلظت موسیلاژ دانه به (QSM) بر اندازه، PDI و

پتانسیل زتا ذرات

برای بررسی تأثیر غلظت QSM بر ویژگی‌های نانوامولسیون دو غلظت مختلف ۰/۱٪ (نمونه‌های ۲، ۳ و ۴) و ۰/۵٪ (نمونه‌های ۵، ۶ و ۷) از موسیلاژ با نمونه فاقد موسیلاژ (نمونه ۱) مورد مقایسه قرار گرفت (شکل ۱). به طور کلی با توجه به شکل (۱) می‌توان گفت که افزایش غلظت موسیلاژ از ۰/۱ به ۰/۵٪ باعث افزایش اندازه ذرات می‌شود. همچنین در یک غلظت ثابت سورفاکتانت (۱:۱)، افزودن موسیلاژ در غلظت ۰/۱٪ (نمونه ۲) نسبت به نمونه فاقد موسیلاژ (کنترل یا نمونه ۱)، اندازه ذرات را کاهش می‌دهد ($p < 0.05$)، علت این کاهش را می‌توان مربوط به افزایش دافعه الکترواستاتیکی بین موسیلاژ و پروتئین دانست که ناشی از

قسمت نیز نشان داد که هرچند تیمار با حمام اولتراسونیک باعث کاهش اندازه ذرات در این حالت می‌شود و از ۱۱۶/۶nm در نمونه ۷ به ۱۱۲/۳nm در نمونه ۹ رسید اما این کاهش نسبت به غلظت‌های پایین‌تر سورفاکتانت چندان قابل توجه نیست و از ۱۶۲/۲nm در نمونه ۵ به ۱۲۱nm در نمونه ۸ رسید؛ بنابراین حمام اولتراسونیک در غلظت‌های کمتر سورفاکتانت به‌خوبی توانایی کاهش اندازه ذرات را دارد.

برای مقایسه روش کم انرژی خودبه‌خودی و روش خودبه‌خودی تیمار شده با حمام اولتراسونیک با روش پر انرژی، بعد از تهیه امولسیون اولیه برای ریزتر شدن ذرات نمونه‌ها توسط هموژنایزر فراصوت تیمار شدند (در بخش ۲-۴ روش تهیه امولسیون اولیه و نهایی توضیح داده شده است). نتایج نشان داد که در غلظت‌های بالای موسیلاژ (۰/۵٪) و نسبت پایین سورفاکتانت (۱:۱)، اختلاف معنی‌داری بین اندازه ذرات دو روش خودبه‌خودی (نمونه ۵) و روش پر انرژی (نمونه ۱۰) وجود دارد. ولی با افزایش غلظت سورفاکتانت (۲:۱) در همان غلظت موسیلاژ (۰/۵٪) اختلاف اندازه ذرات حاصل از دو روش کاهش یافت (مقایسه نمونه‌های ۷ و ۱۱ در شکل ۱). از طرف دیگر با مقایسه روش خودبه‌خودی تیمار شده با حمام اولتراسونیک با روش پر انرژی مشاهده شد که این روش در غلظت‌های پایین سورفاکتانت اندازه ذرات کوچکتری حاصل می‌شود (مقایسه نمونه‌های ۸ و ۱۰) ولی در غلظت بالاتر سورفاکتانت عکس این حالت مشاهده شد (مقایسه نمونه‌های ۹ و ۱۱) یعنی با افزایش سورفاکتانت روش پر انرژی ذرات کوچکتری ایجاد می‌کند. تحقیقات آنوچاپردا و همکاران [۳۴] بر روی نانوامولسیون پایدار شده با سورفاکتانت‌های تویین ۸۰ و HCO-۶۰ نشان داد که نمونه‌های تیمار شده با حمام اولتراسونیک دارای اندازه ذراتی کمتر از ۲۰۰ nm بودند و افزایش زمان سونیکاسیون بیشتر از ۳۰min تأثیر چندانی در کاهش اندازه ذرات ندارد. نتایج مشابهی در استفاده از حمام اولتراسونیک در کاهش اندازه ذرات نانوامولسیون روغن در آب حاوی اسانس سیر توسط حسن‌زاده و همکاران نیز گزارش شده است [۳۵].

تیمار حمام اولتراسونیک و روش پر انرژی به مقدار بسیار اندکی پتانسیل زتا را افزایش دادند ولی این افزایش به لحاظ آماری معنی‌دار نبود ($p > 0/05$) (شکل ۲). دلیل این افزایش اندک شاید تأثیر امواج روی ساختار موسیلاژ و باز شدن زنجیره‌ها و در نتیجه

با پروتئین سویا مشاهده نمودند که با افزایش غلظت تا ۰/۱٪ به امولسیون اندازه ذرات کاهش ولی با افزایش بیشتر غلظت صمغ تا ۰/۵٪ اندازه ذرات افزایش می‌یابد. آن‌ها علت این پدیده را برهم‌کنش‌های محدود بین صمغ و پروتئین دانستند [۳۱]. همان‌طور که در شکل (۲) نشان داده شده است، به‌طور کلی با افزودن موسیلاژ به امولسیون‌ها و همچنین افزایش غلظت موسیلاژ از ۰/۱ به ۰/۵٪ پتانسیل زتا نیز زیادتر شد ($p < 0/05$). از آنجا که اکثر ترکیبات پلی‌ساکاریدی در دامنه وسیعی از pH دارای بار منفی هستند بنابراین دلیل این افزایش می‌تواند افزایش تعداد گروه‌های کربوکسیل موسیلاژ است. تمام نمونه‌ها از نمونه شاهد پتانسیل زتای بیشتری داشتند، این بیشتر بودن پتانسیل زتا در نمونه‌های حاوی موسیلاژ می‌تواند در پایداری آن‌ها نیز مؤثر باشد. محمد زاده و همکاران اثر مخلوط پروتئین آب پنیر تغلیظ شده و صمغ دانه مرو بر پایداری امولسیون را بررسی کرده و بیان کردند که در حضور ۰/۱٪ صمغ، بار منفی ذرات امولسیون افزایش یافته که دلیل آن تجمع بار منفی بیشتر در امولسیون هست [۳۲]. همچنین علی‌پور و همکاران نیز گزارش کردند که در امولسیون پایدار شده با مخلوط صمغ قدومه شیرازی- پروتئین آب پنیر با افزایش نسبت صمغ اندازه ذرات و بار منفی سطح ذرات به دلیل بار منفی بیشتر صمغ و تجمع ذرات آن افزایش می‌یابد [۳۳].

۳.۳. اثر تیمار اولتراسونیک بر اندازه، PDI و پتانسیل زتا قطرات

هدف از انجام تیمار حمام اولتراسونیک بر روی نانوامولسیون‌های خودبه‌خودی پیدا کردن روشی کمکی برای کاهش سورفاکتانت مصرفی در این روش امولسیون‌سازی بود. نتایج این آزمایش نشان داد که با یک تیمار ۳۰ دقیقه‌ای توسط حمام اولتراسونیک به‌خوبی می‌توان میزان سورفاکتانت مصرفی را کاهش داد ($p < 0/05$). برای مشاهده اثر این تیمار نمونه ۵ که دارای بزرگترین اندازه ذرات بود (۱۶۲/۲nm) تحت این تیمار قرار گرفت و مشاهده شد که اندازه ذرات به میزان قابل‌توجهی ($p < 0/05$) کاهش یافت (نمونه ۸، ۱۲۱nm). از طرف دیگر نمونه ۷ که دارای مقدار بیشتر سورفاکتانت (۲:۱) و همان غلظت موسیلاژ (۰/۵٪) بود نیز مورد تیمار قرار گرفت تا اثر این تیمار برای غلظت‌های بالای سورفاکتانت نیز مشاهده شود، نتایج این

همچنین در غلظت‌های بالای موسیلاژ با افزایش سورفاکتانت ویسکوزیته نیز به شکل معنی‌داری زیاد شد. وانگ و همکاران و همچنین سلیمان‌پور و همکاران نتایج مشابهی در اثر افزودن صمغ‌های بذر کتان و قدومه شیرازی بر ویسکوزیته امولسیون‌های پایدار شده توسط پروتئین‌ها مشاهده کردند [۳۱، ۴۰]. آن‌ها دلیل این افزایش را حضور مقادیر زیاد مولکول‌های با وزن مولکولی بالا دانستند که در نهایت باعث افزایش مقاومت نسبت به جریان و ویسکوزیته امولسیون می‌شوند. به‌رحال تمام نمونه‌ها در این آزمایش نسبت به نمونه شاهد (فاقد موسیلاژ) ویسکوزیته بالاتری داشتند.

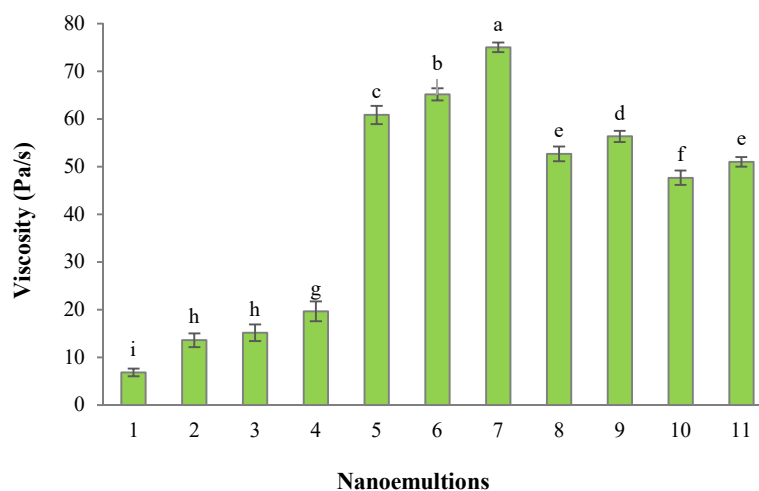
۵.۳. پایداری نانوامولسیون‌ها

پایداری نانوامولسیون‌ها توسط مشاهدات چشمی و اندازه‌گیری ارتفاع لایه سرم جداشده بررسی شد. نتایج حاصل از سنجش خامه‌ای شدن امولسیون در یک دوره زمانی یک ماهه در شکل (۴) نشان داده شده است. بررسی‌های چشمی نشان داد که بعد از گذشت یک روز از تولید، در هیچ یک از نمونه‌ها نشانه‌ای از خامه‌ای شدن مشاهده نشده اما با گذشت زمان پدیده دو فاز شدن در همه نمونه‌ها به‌جز نمونه ۱۱ اتفاق افتاد و بالاترین مقدار دو فاز شدن مربوط به امولسیون ۱ (فاقد موسیلاژ) و کمترین خامه‌ای شدن مربوط به نمونه‌های ۹، ۱۱ و ۸ بود که این سه نمونه اختلاف معنی‌داری باهم نداشتند ($p > 0.05$)؛ بنابراین موسیلاژ در

در دسترس قرار گرفتن گروه‌های کربوکسیل دارای بار منفی بیشتر است. ولی به‌رحال تأثیر این دو روش چندان قابل توجه نبود.

۴.۳. ویسکوزیته

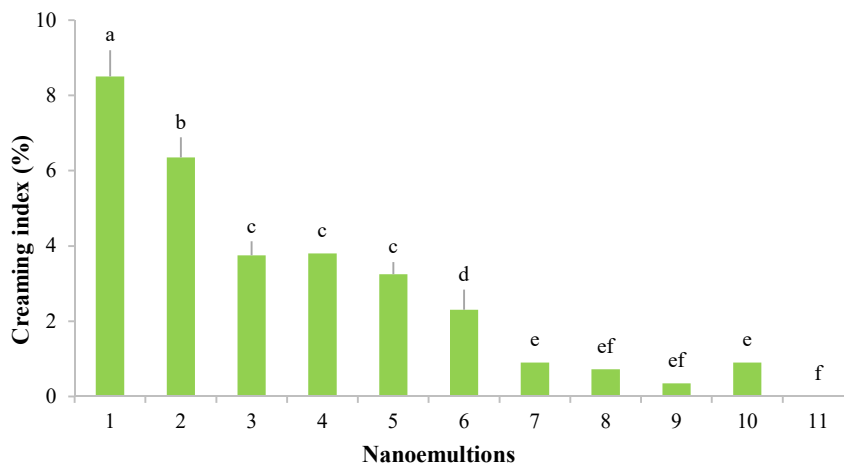
مقدار ویسکوزیته ظاهری امولسیون‌ها در شکل (۳) نشان داده شده است. افزایش غلظت موسیلاژ باعث افزایش معنی‌دار ($p < 0.05$) ویسکوزیته شد. این افزایش در غلظت‌های بالا (۰/۵٪) بسیار قابل توجه بود که این نشان‌دهنده توانایی این موسیلاژ در غلظت‌های بالا در ایجاد حالت ویسکوز در محیط‌های آبی است. در اثر افزایش غلظت موسیلاژ درگیری بین مولکول‌ها افزایش می‌یابد که باعث می‌شود در اثر تنش برشی حرکات آزادانه اجزای مولکولی کاهش یابد [۳۶]. سایر محققان نیز نتایج مشابهی نیز در مورد ویسکوزیته امولسیون صمغ دانه مرو- پروتئین آب پنیر، صمغ بزرک-پروتئین آب پنیر، صمغ عربی-پروتئین آب پنیر و صمغ زانتان-پروتئین آب پنیر گزارش کرده‌اند [۳۷-۳۹]. نکته جالب این بود که نمونه‌های حاصل از تیمار کمکی حمام اولتراسونیک و روش پر انرژی ویسکوزیته کمتری در مقایسه با روش کم انرژی خودبه‌خودی داشتند این دو تیمار فراصوت (حمام و پروب) باعث کاهش ویسکوزیته شدند که دلیل این امر احتمالاً به خاطر اثر امواج اولتراسونیک روی ساختار موسیلاژ و باز شدن ساختار آن‌ها و در نتیجه کاهش ویسکوزیته آن است.



شکل (۳) ویسکوزیته ظاهری امولسیون‌ها در دمای محیط

حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح $p < 0.05$ است

Fig. 3. Apparent viscosity of nanoemulsions at ambient temperature. Different superscript letters among bars denote significant difference ($p < 0.05$)



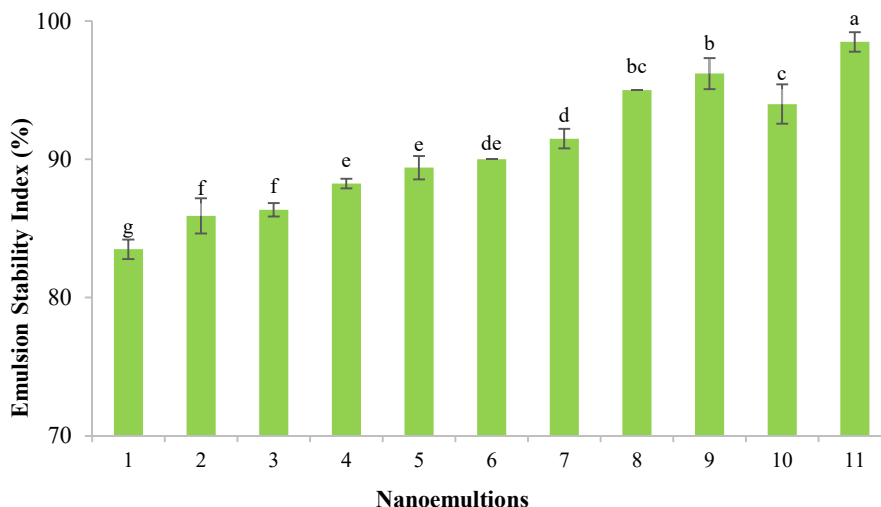
شکل (۴) شاخص خامه‌ای شدن نانوامولسیون‌ها بعد از یک ماه نگهداری در دمای ۵°C

حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح $p < 0.05$ است

Fig. 4. Creaming index of nanomulsions after one month storage at 5 °C
Different superscript letters among bars denote significant difference ($P < 0.05$)

موسیلاژ دانه به از زنجیرهای خطی گلوکان، گالاکتو گلوکان/مانو گلوکان یا گالاکتو-مانو-گلوکان تشکیل شده است، این ساختار همچنین حدود ۱۰ تا ۲۵٪ پروتئین دارد که بیشتر اسید-آمینوهای آن، گلوتامیک اسید، آسپارتیک اسید و آسپاراژین هستند [۴۳]. دلیل بالاتر بودن میزان خامه‌ای شدن در امولسیون‌های حاوی غلظت کمتر موسیلاژ را می‌توان با این فرض توجیه کرد که غلظت بیوپلیمرهای جذب‌شده در سطح قطرات روغن به اندازه کافی زیاد نیست تا کل سطح را اشباع کند، بنابراین ممکن است مولکول‌های بلند زنجیر موسیلاژ دانه به با ایجاد یک پل بین چند قطره آن‌ها را جذب هم کنند. این پدیده به‌عنوان فلوکولاسیون لخته شناخته‌شده که باعث ایجاد لخته‌های گسترده در غلظت‌های کم امولسیفایرهای ضعیف می‌شود و می‌تواند باعث خامه‌ای شدن سریع‌تر نمونه‌های حاوی ۰/۱٪ موسیلاژ شود [۴۱]. سلیمان‌پور و همکاران نیز عنوان داشتند که غلظت‌های پایین صمغ قدومه شهری میزان خامه‌ای شدن امولسیون را به علت ایجاد اتصال بین قطرات روغن توسط صمغ و بروز پدیده فلوکولاسیون نقصانی افزایش می‌دهد درحالی‌که کاهش خامه‌ای شدن در غلظت‌های بالای صمغ به دلیل افزایش ویسکوزیته امولسیون و تشکیل شبکه در اثر افزودن صمغ دانه قدومه شهری است [۴۰].

غلظت‌های بالا می‌تواند باعث کاهش دو فاز شدن شود. نتایج مشابهی توسط خلوفی و همکاران [۳۸] برای امولسیون حاوی صمغ بزرک-ایزوله پروتئین آب پنیر گزارش شده است، آن‌ها دلیل کاهش خامه شدن با افزایش صمغ را افزایش ویسکوزیته ناشی از صمغ اعلام کرده‌اند. البته موسیلاژ دانه به‌علاوه بر خواص غلیظ‌کنندگی به علت داشتن ویژگی آمفیفیلیک قابلیت امولسیون‌کنندگی نیز دارد [۴۱]. از طرف دیگر با افزایش غلظت سورفاکتانت برای هر دو غلظت ۰/۱ و ۰/۵٪ نیز شاهد کاهش دو فاز شدن نمونه بودیم که دلیل این کاهش می‌تواند ریزتر شدن اندازه ذرات روغن و افزایش دافعه الکتریکی بین آن‌ها باشد (شکل ۲) چراکه با افزایش غلظت صمغ مقدار بار منفی بیشتر شد. نمونه‌های که بعد تولید با حمام اولتراسونیک تیمار شده بودند نسبت به نمونه‌های تیمار نشده درصد خامه‌ای شدن کمتری داشتند اما در مقایسه با نمونه‌های که توسط روش پراش تولید شده‌اند در غلظت سورفاکتانت برابر تفاوت معنی‌داری نداشتند. نسبت فاز پراکنده به فاز پیوسته و غلظت و ماهیت موسیلاژ موجود در فاز پیوسته ازجمله عوامل مؤثر بر پایداری سامانه‌های امولسیونی هستند. به‌طورمعمول، پلی‌ساکاریدهای گیاهی به‌عنوان پایدارکننده‌های امولسیونی نوع روغن در آب شناخته می‌شوند. این زیست پلیمرها از طریق یک مکانیسم غیر جاذب و با کاهش حرکت قطرات روغن به پایداری امولسیون کمک می‌کنند [۴۲].



شکل (۵) شاخص پایداری نانوامولسیون‌ها بلافاصله بعد از تولید

حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح $p < 0.05$ است

Fig. 5. Emulsion stability index of nanoemulsions immediately after production
Different superscript letters among bars denote significant difference ($p < 0.05$)

آن $14/5\text{mV}$ - بود. همچنین تیمار حمام اولتراسونیک و روش پر انرژی نیز شاخص پایداری بالاتری را نسبت روش خودبه‌خودی نشان دادند. مؤیدزاده و همکاران گزارش کردند که هر دو عامل SOR و غلظت صمغ روی پایداری امولسیون روغن ماهی در آب مؤثر هستند و اعلام کردند که با افزایش غلظت صمغ می‌توان در SOR پایینتر پایداری امولسیون را افزایش داد [۱۳]. آن‌ها همچنین اعلام کردند که ژلان جذب شده در سطح قطرات می‌تواند ویسکوزیته فاز آبی را افزایش دهد و باعث کاهش حرکت قطرات روغن و خامه‌ای شدن شود. اکبری و همکاران نیز نتایج مشابهی را برای صمغ دانه مرو-پروتئین آب پنیر روی پایداری امولسیون روغن در آب گزارش کردند [۳۹].

۴. نتیجه‌گیری

در این مطالعه، تأثیر سطوح مختلف موسیلاژ دانه به و سورفاکتانت توپین ۸۰ در شکل‌گیری نانوامولسیون خود به خودی مورد بررسی قرار گرفت. سپس تأثیر تیمار کمکی حمام اولتراسونیک را روی نانوامولسیون‌های حاصله مورد آزمایش قرار گرفت و درنهایت با روش پر انرژی هموزنایزر فراصوت مقایسه شد. مشاهده شد که نانوامولسیون‌ها با قطر کمتر از 200nm را می‌توان با افزودن ساده فاز آلی که حاوی روغن و سورفاکتانت است به فاز آبی در حین همزدن تهیه کرد که این روش به اسم

یکی از روش‌های رایج در تسریع الحاق ذرات چربی در امولسیون‌ها استفاده از سانتریفیوژ است؛ زیرا نیروی گریز از مرکز در این روش برخورد و الحاق ذرات چربی را تسریع می‌کند. نتایج شاخص پایداری امولسیون که از مقدار سرم جداشده از امولسیون توسط سانتریفیوژ به دست می‌آید در شکل (۵) نشان داده شده است. در اینجا با افزایش میزان غلظت موسیلاژ و سورفاکتانت شاخص پایداری امولسیون نیز افزایش یافت. با افزایش غلظت موسیلاژ و توپین ۸۰ خاصیت امولسیون‌کنندگی افزایش می‌یابد، از طرف دیگر با افزایش غلظت موسیلاژ، ویسکوزیته سیستم نیز افزایش می‌یابد؛ بنابراین با توجه به اثر این دو عامل روی افزایش مقاومت در برابر جریان نانوامولسیون‌ها حین سانتریفیوژ، کاهش سرعت جداسازی ذرات چربی و افزایش پایداری سینتیکی نانوامولسیون اتفاق افتاد [۳۹]. یکی دیگر از عوامل مؤثر در پایداری امولسیون پتانسیل زتای سیستم امولسیون است که هرچقدر مقدار آن از صفر دورتر باشد (مثبت یا منفی) به‌واسطه دافعه الکتریکی بین ذرات امولسیون پایدارتر است. در این مطالعه مقدار این پارامتر بین $10/6\text{mV}$ - تا $14/5\text{mV}$ - متغیر بود. البته چون مقدار پتانسیل زتا چندان زیاد نبود میزان تأثیر این پارامتر در پایداری نانوامولسیون‌ها کمتر از تأثیر ویسکوزیته حاصل از موسیلاژ است. بیشترین پایداری مربوط به نمونه تهیه‌شده توسط روش پر انرژی با غلظت سورفاکتانت ۲:۱ بود که پتانسیل زتای

نشان داد که نانوامولسیون‌های که دارای غلظت بالاتری از موسیلاژ بودند ویسکوزیته بالاتری داشتند که این ویسکوزیته بالاتر خود مهمترین عامل در پایداری نانوامولسیون‌ها بود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان، صمیمانه از حمایت مالی صورت گرفته توسط صندوق حمایت از پژوهشگران جوان (Iran National Science Foundation: INSF) (No. 96011426/2018) تشکر می‌نمایند.

روش امولسیون‌سازی خودبه‌خودی شناخته شده است. اندازه قطرات در این روش بستگی به نسبت سورفاکتانت به روغن و غلظت موسیلاژ داشت. تیمار کمکی بعد از تهیه نانوامولسیون خودبه‌خودی تأثیر معنی‌داری روی کاهش اندازه ذرات داشت و نشان داد که با این روش می‌توان مصرف سورفاکتانت غیر یونی توین ۸۰ را کاهش داد؛ چراکه مهم‌ترین عامل در محدودیت روش خودبه‌خودی مقدار بالای سورفاکتانت سنتزی است که در بسیاری از مواد غذایی می‌تواند ناخوشایند باشد. همچنین نتایج

منابع

- 157.
- [10] Roohinejad, S., et al., (2018). Emulsion-based Systems for Delivery of Food Active Compounds: Formation, Application, Health and Safety. Wiley Online Library.
- [11] Noroozi, M., Radiman, S., Zakaria, A., (2014). Influence of sonication on the stability and thermal properties of Al₂O₃ nanofluids. *J. Nanomaterials*. Article ID 612417, 2014, 10 pages.
- [12] Solans, C., Solé, I., (2012). Nano-emulsions: formation by low-energy methods. *Curr. Opin. Colloid Interface. Sci.* 17(5), 246-254.
- [13] Moayedzadeh, S., Khosrowshahi asl, A., Gunasekaran, S., Madadlou, A., (2018). Spontaneous emulsification of fish oil at a substantially low surfactant-to-oil ratio: Emulsion characterization and filled hydrogel formation. *Food Hydrocolloid.* 82, 11-18.
- [14] Saberi, A.H., Fang, Y., McClements, D.J., (2013). Fabrication of vitamin E-enriched nanoemulsions: factors affecting particle size using spontaneous emulsification. *J. Colloid Interface Sci.* 391, 95-102.
- [15] Anton, N., Benoit, J.-P., Saulnier, P., (2008). Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—a review. *J. Contr. Release.* 128(3), 185-199.
- [16] Najafi-Taher, R., Amani, A., (2017). Nanoemulsions: colloidal topical delivery systems for anticancer agents—A Mini-Review. *Nanomedicine Res. J.* 2(1), 49-56.
- [17] Pezeshky, A., Ghanbarzadeh, B., Hamishehkar, H., Moghadam, M., Fathollahi, I., (2016). Vitamin A palmitate-loaded nanoemulsions produced by spontaneous emulsification method: effect of surfactant
- [1] Komaiko, J., McClements, D.J., (2015). Low-energy formation of edible nanoemulsions by spontaneous emulsification: Factors influencing particle size. *J. Food Eng.* 146, 122-128.
- [2] McClements, D.J., Rao, J., (2011). Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 51(4), 285-330.
- [3] Velikov, K.P., Pelan, E., (2008). Colloidal delivery systems for micronutrients and nutraceuticals. *Soft Matter.* 4(10), 1964-1980.
- [4] Wooster, T.J., Golding, M., Sanguansri, P., (2008). Impact of oil type on nanoemulsion formation and Ostwald ripening stability. *Langmuir.* 24(22), 12758-12765.
- [5] Mason, T., Wilking, J., Meleson, K., Chang, C., Graves, S., (2006). Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. *J. Phy. condens. matter.* 18(41), 635-666.
- [6] Komaiko, J., McClements, D.J., (2014). Optimization of isothermal low-energy nanoemulsion formation: hydrocarbon oil, non-ionic surfactant, and water systems. *J. Colloid. Interface Sci.* 425, 59-66.
- [7] Jafari, S.M., He, Y., Bhandari, B., (2007). Production of sub-micron emulsions by ultrasound and microfluidization techniques. *J. Food Eng.* 82(4), 478-488.
- [8] Tadros, T., Izquierdo, P., Esquena, J., Solans, C., (2004). Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in Colloid. Interface Sci.* 108, 303-318.
- [9] Abbas, S., Hayat, K., Karangwa, E., Bashari, M., Zhang, X., (2013). An overview of ultrasound-assisted food-grade nanoemulsions. *Food Eng. Rev.* 5(3), 139-

- [30] Xu, D., Wang, X., Jiang, J., Yuan, F., Gao, Y., (2012). Impact of whey protein-Beet pectin conjugation on the physicochemical stability of β -carotene emulsions. *Food Hydrocolloid*. 28(2), 258-266.
- [31] Wang, Y., Li, D., Wang, L.-J., Adhikari, B., (2011). The effect of addition of flaxseed gum on the emulsion properties of soybean protein isolate (SPI). *J. Food Eng.* 104(1), 56-62.
- [32] Mohammadzadeh ,H., Koocheki, A., Kadkhodae, R., Razavi, S.M., (2013). Physical and flow properties of d-limonene-in-water emulsions stabilized with whey protein concentrate and wild sage (*Salvia macrosiphon*) seed gum. *Food Res. Int.* 53(1), 312-318.
- [33] Alipour, A., Koocheki, A., Kadkhodae, R., Varidi, M., (2015). The effect of alyssum homolocarpum seed gum-whey protein concentrate on stability of oil-in-water emulsion. *Food Sci. Tech.* 12(48), 163-174
- [34] Anuchapreeda, S., Fukumori, Y., Okonogi, S., Ichikawa, H., (2012). Preparation of lipid nanoemulsions incorporating curcumin for cancer therapy. *J. nanotechnology*. Article ID 270383, 2012, 11 pages.
- [35] Hassanzadeh, H., Alizadeh, M., Bari, M.R., (2018). Formulation of garlic oil-in-water nanoemulsion: antimicrobial and physicochemical aspects. *IET Nanobiotechnology*. 12(5), 647-652.
- [36] Maskan, M., Göğüş, F., (2000). Effect of sugar on the rheological properties of sunflower oil-water emulsions. *J. Food Eng.* 43(3), 173-177.
- [37] Khalloufi, S., Alexander, M., Goff, H.D., Corredig, M., (2008). Physicochemical properties of whey protein isolate stabilized oil-in-water emulsions when mixed with flaxseed gum at neutral pH. *Food Res. Int.* 41(10), 964-972.
- [38] Khalloufi, S., Corredig, M., Goff, H.D., Alexander, M., (2009). Flaxseed gums and their adsorption on whey protein-stabilized oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloid*. 23(3), 611-618.
- [39] Akbari, E., Ghorbani, M., Sadeghi Mahonak, A., Alami, M., Kashaninejad, M., Nasrollahzadeh, A., (2016). Investigation of sage seed gum and whey- protein on the stability of the Oil-water emulsion with using response surface methodology (RSM). *Innovat Food Sci. Emerg. Tech.* 3(4), 47-56.
- [40] Soleimanpoor, M., Kadkhodae, R., Koocheki, A., Razavi, S., (2013). Effect of qodumeh shahri seed gum on physical properties of corn-oil in water emulsion prepared by high intensity ultrasound. *Iranian Food Sci. Tech. Res. J.* 9(1), 21-30.
- [41] Kirtil, E., Oztop, M.H., (2016). Characterization of emulsion stabilization properties of quince seed extract and oil on droplet size and stability. *J. Res. Innovat. Food Sci. Tech.* 4(4), 299-314.
- [18] Jouki, M., et al., (2014). Optimization of extraction, antioxidant activity and functional properties of quince seed mucilage by RSM. *Int. J. Biolo. Macro.* 66, 113-124.
- [19] Ghadermazi, R., Khosrowshahi-Asl, A., Tamjidi, F., (2019). Optimization of whey protein isolate-quince seed mucilage complex coacervation. *Int. J. Biolo. Macro.* 131, 368-377.
- [20] Khalesi, H., Emadzadeh, B., Kadkhodae, R., Fang, Y., (2016). Whey protein isolate-Persian gum interaction at neutral pH. *Food Hydrocolloid*. 59, 45-49.
- [21] Ozturk, B., et al., (2015). Formation and stabilization of nanoemulsion-based vitamin E delivery systems using natural biopolymers: Whey protein isolate and gum arabic. *Food Chem.* 188, 256-263.
- [22] Shamsara, O., et al., (2015). Effect of ultrasonication, pH and heating on stability of apricot gum-lactoglobuline two layer nanoemulsions. *Int. J. Biolo. Macro.* 81, 1019-1025.
- [23] Kaltsa, O., et al., (2013). Ultrasonic energy input influence on the production of sub-micron o/w emulsions containing whey protein and common stabilizers. *Ultrasonics sonochem.* 20(3), 881-891.
- [24] Abbastabar, B., Azizi, M.H., Adnani, A., Abbasi, S., (2015). Determining and modeling rheological characteristics of quince seed gum. *Food Hydrocolloid*. 43, 259-264.
- [25] Zhang, R., Zhang, Z., Kumosani, T., Khoja, S., Abualnaja, K.O., McClements, D.J., (2016). Encapsulation of β -carotene in nanoemulsion-based delivery systems formed by spontaneous emulsification: influence of lipid composition on stability and bioaccessibility. *Food biophys.* 11(2), 154-16.۴
- [26] McClements, D.J., (2011). Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. *Soft Matter*. 7(6), 2297-2316.
- [27] Anton, N., Vandamme, T.F., (2009). The universality of low-energy nano-emulsification. *Int. J. Pharm.* 377(1-2), 142-147.
- [28] Prabhakar, K., Afzal, S.M., Surender, G., Kishan, V., (2013). Tween 80 containing lipid nanoemulsions for delivery of indinavir to brain. *Acta. Pharm. Sin. B.* 3(5), 345-353.
- [29] Dickinson, E., (2009). Hydrocolloid as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food Hydrocolloid*. 23(6), 1473-1482.



as a new source of hydrocolloid. *Food Res. Int.* 85, 84-94.

[42] Dickinson, E., Stainsby, G., (1988). Advances in food emulsions and foams Edited by E. Dickinson and G. Stainsby, Elsevier Applied Science, London, 344-385.

[43] Ritzoulis, C., Marini, E., Aslanidou, A., Georgiadis, N., Karayannakidis, P.D., Koukiotis, C., Filotheou, A., Lousinian, S., Tzimpilis, E., (2014). Hydrocolloid from quince seed: Extraction, characterization, and study of their emulsifying/stabilizing capacity. *Food Hydrocolloid.* 42, 178-186.

*Research Article***Effect of Ultrasonic Bath, Surfactant to Oil Ratio and Quince Seed Mucilage Concentration on Spontaneous Nanoemulsion Properties****Reza Ghadermazi^{1*}, Asghar Khosrow Shahi Asl², Mohammad Hossein Azizi³, Fardin Tamjidi⁴**

1. Ph.D. Student, Food Science and Technology, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.
2. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.
3. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
4. Assistant Professor, Department of Food Science and Engineering, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran.

Abstract

The aim of this study was to investigate the properties of oil in water nanomulsion stabilized with whey protein isolate (1% w/v) and quince seed mucilage (0.1 and 0.5% w/v) by low energy method of spontaneous emulsification and high energy method of ultrasound homogenizer. Since the main problem in utilization of spontaneous emulsification method is the use of high amounts of synthetic surfactants, one of the objectives of this study was to investigate the effect of different ratios of surfactant to oil (SOR= 1:1, 2:1 and 3:2) and ultrasonic bath supplementation on spontaneous nanomulsion properties. Nanoemulsion characteristics such as particle size, zeta potential, viscosity and stability of nanomulsion were studied. In this study, nanoemulsions with a particle size less than 200 nm were well prepared. Increasing the mucilage concentration and the surfactant to oil ratio resulted in a significant reduction in particle size, a slight increase in zeta potential (increase in negativity), increased viscosity, decreased creaming index and increased emulsions stability index. The nanoemulsions from the high energy method and the nanoemulsions treated with ultrasonic bath have the lowest particle size, creaming index and highest emulsions stability index. The results of this study showed that by a simple treatment with an ultrasonic bath, it was possible to create spontaneous nanoemulsions with very small particle size (with nm dimensions) without using high concentrations of synthetic surfactants.

Keywords: Spontaneous Nanoemulsion, Ultrasonic Bath, Quince Seed Mucilage, Whey Protein Isolated.

* Corresponding author: r.ghadermazi@urmia.ac.ir