



## امکان‌سنجی تولید نوشیدنی انرژی‌زا فراسودمند حاوی کیتوزم تانن- اسیدلینولئیک کانژگه

مرتضی جمشید عینی<sup>۱</sup>، حمید توکلی پور<sup>۲\*</sup>، رضوان موسوی نادوشن<sup>۳</sup>، محسن مختاریان<sup>۴</sup>

۱- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۴- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران

اطلاعات مقاله	چکیده
<b>تاریخ های مقاله :</b> تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۳/۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۷/۹	امروزه با توجه به علاقه برای مصرف مواد غذایی فراسودمند و گسترش روز افزون بیماری‌های قلبی و عروقی، تمایل به مصرف محصولات فراسودمند افزایش یافته است. بنابراین محققان به دنبال بهینه‌سازی فرمولاسیون‌های جدید محصولات با ویژگی‌های عملگرا هستند و در این راستا، مطالعه حاضر با هدف تولید نوشیدنی انرژی‌زا فراسودمند حاوی کیتوزم تانن- اسیدلینولئیک کانژگه انجام شد. پس از استخراج ترکیبات زیست فعال (بوژه تانن) از پوست انار همراه با اسید لینولئیک کنژوگه در ساختار کیتوزوم‌ها گنجانده شدند. پس از بررسی پایداری اکسایشی اسید لینولئیک، بررسی طیف‌سنجی FTIR و ریخت‌شناسی کیتوزوم‌ها، به میزان ۰/۷۵ گرم در فرمولاسیون نوشیدنی‌ها افزوده شدند. نتایج تأثیر معنادار غلظت‌های مختلف عصاره زیستی انار بر پایداری اکسیداتیو اسید لینولئیک را نشان داد. بررسی طیف‌سنجی FTIR بیانگر وجود ساختارهای زیست فعال انار و اسیدلینولئیک در کیتوزوم‌ها بود. ذرات تقریباً کروی کیتوزان با اندازه nm ۷۷/۶۶ و ۷۹/۹۰ با یکنواختی مشاهده شد. افزودن نانو کیتوزوم‌ها سبب افزایش معنادار pH (کاهش اسیدیته)، افزایش کدورت، ویسکوزیته، دوفاز شدن و محتوی فنلی را نشان داد. همچنین کاهش شاخص *L و افزایش *a و *b در نوشیدنی‌ها گزارش شد. نتایج حاضر نشان داد که پلیمرهای زیستی نقش کلیدی در پایداری ساختار غشای لیپوزومی و انتشار پایدار مولکول‌های به دام افتاده توسط یک مانع فضایی بر روی سطح دارند. این یک سکوی بالقوه را جهت طراحی مناسب حامل‌ها برای مواد مغذی یا نگهدارنده‌ها به منظور افزایش ماندگاری و ایمنی ماتریس‌های غذایی فراهم خواهد کرد.
<b>کلمات کلیدی:</b> اسید لینولئیک کنژوگه، تانن، کیتوزوم، عصاره پوست انار، نوشیدنی انرژی‌زا	
DOI:10.22034/FSCT.22.158.99. *مسئول مکاتبات: tavakolipour@gmail.com	

## ۱- مقدمه

امروزه محققان دریافته‌اند که غذاها علاوه بر تامین مواد مغذی ضروری، حاوی اجزایی هستند که ممکن است در حفظ سلامت و پیشگیری از بیماری‌های مزمن مفید باشند. اجزای موجود در محصولات حیوانی هر کدام با تأثیر خاصی بر سلامت انسان مرتبط هستند، به همین دلیل است که علاقه به اسیدهای مزدوج به طور قابل توجهی افزایش یافته است [۱]. اسید لینولئیک مزدوج یک مکمل غذایی است که برای کاهش توده بدن، آسیب عضلانی و پاسخ‌های التهابی استفاده می‌شود. بنابراین، در چند دهه گذشته توجه علمی قلیل توجه‌ای را به خود جلب کرده است. اسید لینولئیک خانواده‌ای از اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه است که به مخلوطی از ایزومرهای موضعی و هندسی اسید لینولئیک با پیوندهای دوگانه مزدوج اطلاق می‌شود که می‌تواند در هر موقعیتی از زنجیره کربنی، معمولاً بین ۸ تا ۱۳، در یک پیکربندی سیس<sup>۱</sup> یا ترانس<sup>۲</sup> قرار گیرد [۲]. رایج‌ترین ایزومرها cis-9, trans-11 (c9,t11) و trans-10, cis-12 (t10,c12) هستند که به طور طبیعی در فرآورده‌های شیری (شیر، پنیر و ماست) و گوشت نشخوارکنندگان (گوشت گاو و بره) وجود دارند [۳]. مطالعات نشان داد که اسید لینولئیک، علاوه بر استفاده برای درمان بیماری‌های قلبی عروقی، سندرم متابولیک و آسم می‌تواند اثرات سلامتی‌بخش مختلفی مانند خاصیت ضد سرطانی، مهار تصلب شرایین، افزایش عملکرد سیستم ایمنی، متابولیسم کبد و قند خون داشته باشد. اما معتبرترین یافته‌ها در مورد اثرات سلامتی‌بخش اسید لینولئیک شامل ضد سرطان و کاهش اثرات چربی بدن است [۴]. مطالعات تحقیقاتی جدیدتر نشان می‌دهد که هر دو ایزومر اسید لینولئیک دارای اثرات سلامتی بسیار متفاوتی هستند. CLA (t10,c12) یک عامل ضد سرطان، ضد چاقی و ضد دیابت است، درحالی‌که CLA (c9,t11) عمدتاً ضد التهاب است. همچنین این احتمال وجود دارد که برخی از اثرات ناشی از عمل هم افزایی این ایزومرها باشد [۱].

انار (*Punica granatum*) بومی کشور ایران تا کوه‌های هیمالیا در شمال هند است و که در آب و هوا و اقلیم نیمه خشک معتدل بیابانی، خشک، نیمه خشک، نیمه مرطوب و مرطوب سرد مناطق غربی و مرکزی کشور که دارای انواع خاک‌های متفاوت است به صورت درخت و درختچه در غالب ۳۰۰ گونه کشت می‌گردد. این گیاه هم چنین در مناطق بسیار گرم که بارندگی تنها در زمستان رخ می‌دهد و دارای تابستان‌های خشک است به طور طبیعی دیده می‌شود. امروزه پراکنش درخت انار در آسیای مرکزی، مناطق مدیترانه‌ای، آسیای جنوب شرقی و امریکای شمالی گزارش شده است [۵]. در ایران ۶۷۰ هزار تن [۶] و در جهان تقریباً ۲۱۸۰۰۰ تن کشت می‌شود. پس از اثبات خواص ضد میکروبی و ضد ویروسی انار، بطور قابل توجهی کشت آن افزایش یافته است [۵]. پوست انار ۴۰ درصد از کل میوه آن را تشکیل می‌دهد. پوست انار سرشار از پلی فنول است و از آنجاییکه پلی‌فنل‌ها عوامل آنتی‌اکسیدانی هستند، می‌توانند توانایی دارویی انار را نشان دهند. بسیاری از محققین تأیید کرده‌اند که پوست انار یک منبع غنی از مخلوط‌های فعال زیستی از جمله الازیتانین‌ها، کاتچین‌ها، روتین و اپی‌کاتچین‌ها است [۷]. همچنین مطالعات نشان داده که پوست انار سرشار از تانن‌های قابل هیدرولیز در الازیتانین‌ها است. نشان داده شده است محتوی تانن در پوست انار از محتوی فلاونوئیدهای (عمدتاً آنتوسیانین‌ها) آن بیشتر است [۵]. تانن‌های موجود در انار عمدتاً تانن‌های متراکم و تانن‌های قابل هیدرولیز هستند. تانن‌های قابل هیدرولیز تقریباً ۸۵ درصد از تانن‌های موجود در پوست انار را تشکیل می‌دهند [۸]. بسیاری از فعالیت‌های زیستی مختلف تانن‌ها از جمله آنتی‌اکسیدان، ضد باکتری، ضد قارچ، ضد تومور و غیره نیز نشان داده شده است. گروه‌های ارتو دی هیدروکسیل موجود در تانن عامل شلات یون‌های فلزی هستند. درجه پلیمریزاسیون بالا و وزن مولکولی نقش مهمی در فعالیت آنتی‌اکسیدانی تانن‌ها دارد. هنگامیکه تانن

کافئین، با یا بدون سایر مواد افزودنی است. این نوشیدنی‌ها معمولاً حاوی مقادیر زیادی کافئین، قندهای افزوده شده، سایر افزودنی‌ها و محرک‌های قانونی مانند گوارانا<sup>۲</sup>، تائورین<sup>۳</sup> و ال-کارنیتین<sup>۵</sup> هستند [۱۴]. علاوه بر این، نوشیدنی‌های کم الکل نیز مزایای بالقوه‌ای برای سلامتی دارند، مانند کاهش کلسترول و افزایش لیپوپروتئین با چگالی بالا، که به پیشگیری از بیماری قلبی و کاهش خطرات بیماری‌های مرتبط با الکل کمک می‌کند [۱۵]. بنابراین این مطالعه امکان تولید یک نوشیدنی انرژی‌زا سالم فراسودمند را توصیف می‌کند. کیتوزوم‌های اسیدلینولیک-تانن این پتانسیل را دارد که امکان بهبود کیفیت محصول از طریق افزایش غنی‌سازی ترکیبات فعال زیستی را فراهم کند.

## ۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد: میوه انار تازه از باغی در استان ساوه (در شمال استان مرکزی بین عرض جغرافیایی (۳۴ درجه و ۴۵ دقیقه عرض) واریته *Wonderful*، روغن کانولا از شرکت لادن (ایران)، اسید لینولیک از شرکت HSF (چین) و مواد شیمیایی مورد نیاز تحقیق از شرکت Merck (آلمان) خریداری شدند.

۲-۲- استخراج ترکیبات زیست فعال (بویژه تانن) از پوست انار: ابتدا پوست چرمی بیرونی و سایر ضایعات زیستی آن (مزوکارپ و غشای تقسیم کننده) از دانه‌ها (آریل‌ها) حذف شد. سپس ضایعات زیستی انار تازه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد آبگیری شد و در خشک کن انجمادی (Operon- Korea) (۵۵ درجه سلسیوس، ۰/۱۵ میلی‌متر جیوه) به مدت ۴۸ ساعت خشک شد تا زمانیکه رطوبت اولیه آن از  $0/5 \pm 69/93$  درصد در مبنای تر به میزان رطوبت ایمن تقریباً  $4/76$  در مبنای تر کاهش یافت [۱۶]. پس از مرحله خشک کردن، محصول نهایی به کمک آسیاب آزمایشگاهی (LB20ES, Waring, USA) تا

به عنوان بخشی از رژیم غذایی انسان یا حیوان مصرف می‌شود، تانن‌ها ممکن است با تشکیل کمپلکس‌هایی با پروتئین و آهن بر استفاده از پروتئین تأثیر بگذارند. آنها می‌توانند با تشکیل پیوندهای هیدروژنی بین گروه‌های فنلی و گروه‌های NH- پیوندها که توسط آنزیم‌های گوارشی شکسته نمی‌شوند، پیوند قوی با پروتئین‌ها ایجاد کنند [۹]. لیپوزوم‌ها ذرات کروی (وزیکول) با یک یا چند غشای دو لایه، با ویژگی‌های آمفی پاتیک (دو دوستی) هستند که از تجمع مولکول‌های چربی یا فسفولیپید چربی (به ویژه فسفاتیدیل کولین) در محیط آبی تشکیل می‌شوند. علیرغم مزایای فراوان لیپوزوم‌ها (به ویژه امکان تولید از ترکیبات سالم و بی‌ضرر برای سلامتی انسان)، تنها تعداد کمی از لیپوزوم‌های اصلاح نشده پایدار هستند و اکثر آنها تمایل زیادی به تجمع دارند که به مرور زمان ممکن است منجر به به نشست محتوای به دام افتاده شود [۱۰]. برای غلبه بر این نقایص و برای پایداری بیشتر، اصلاح سطح حامل‌های لیپوزومی با استفاده از پلیمرهای زیستی مانند پکتین یا کیتوزان برای طراحی سیستم‌های تحویل موثرتر انجام شده است. زیرا کپسوله سازی با کاهش واکنش با محیط خارجی، پلی فنل‌ها را در برابر تخریب، اثرات نامطلوب نور، رطوبت و اکسیژن محافظت می‌کند و در نتیجه به افزایش عمر مفید آنها کمک می‌کند. علاوه بر این، کپسوله‌سازی منجر به کاهش تبخیر هسته، آزادسازی کنترل شده هسته، رقیق شدن هسته (در مواردی که فقط مقادیر کمی از ترکیبات فنلی مورد نیاز است) و افزایش نیمه عمر خواهد داشت [۱۰] و [۱۱]. Ramli و همکاران (۲۰۱۹)، افزایش راندمان کپسولاسیون عصاره بره موم با کیتوزم و پایداری کیتوزم‌ها پس از یک ماه ذخیره‌سازی را نشان دادند [۱۲]. Silva و همکاران [۱۳]. نیز نشان دادند بازده کل استخراج از ۳۵ به ۴۸/۱ درصد با افزایش غلظت کیتوزان (۰/۴ به ۱ درصد) افزایش یافت.

سازمان غذا و دارو نوشیدنی‌های انرژی‌زا را به عنوان دسته‌ای از نوشیدنی‌های غیر الکلی تعریف می‌کند که معمولاً حاوی

3- Guarana

4- Taurine

5 -L-Carnitine

دربندی و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد، تا شروع آزمایش‌های بعدی نگهداری شد [۱۹].

**۲-۴- تولید ریز کپسول کیتوزوم حاوی هسته‌های زیست فعال (تانن - اسید لینولئیک کونژوگه):** با هدف ممانعت از اکسیداسیون اسید لینولئیک، مقادیر مختلفی از عصاره زیستی خشک شده (۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰، ۱۰۰۰، ۱۲۰۰، ۱۴۰۰، ۱۶۰۰، ۱۸۰۰ و ۲۰۰۰ mg/ml) به اسید لینولئیک اضافه شد. ۱۰ درصد اسید لینولئیک به روغن کانولای بدون آنتی‌اکسیدان افزوده شد. نرخ اکسایش اسید لینولئیک (به روش آزمون ماندگاری تسریع شده یا (ALST)<sup>۶</sup> در مدت زمان ثابت (۶۰ دقیقه)) از طریق شاخص پراکسید پایش گردید تا مقدار بهینه (یعنی غلظتی که بیشترین میزان ممانعت از اکسایش لینولئیک اسید را داشته باشد) آنتی‌اکسیدان طبیعی عصاره زیستی خشک شده تعیین گردید [۱۹]. در نهایت، کیتوزوم‌ها با استفاده از روش حرارتی تولید شدند. برای این منظور، ابتدا لسیتین سویای پودر شده در حلال اتانول (۱ درصد وزنی / حجمی) حل شد. در مرحله‌ی بعد در تبخیر کننده‌ی چرخشی تحت خلاء، حلال حذف شد تا یک لایه نازک (تشکیل وزیکول چند لایه لیپیدی لیپوزوم) در ته بالن ایجاد شد. سپس بالن در دسیکاتور قرار داده شد تا باقی‌مانده حلال نیز جدا گردید. در ادامه با استفاده از هیتر مغناطیسی (MS300H, Glassco, Netherlands) لایه لیپیدی تشکیل شده در بافر فسفات حاوی ترکیبات فعال زیستی حل گردید. تیمار فراصوت در دامنه ۹۰ درصد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد [۲۰].

**۲-۵- تهیه نوشیدنی انرژی‌زای فراسودمند:** ابتدا اجزا فرمولاسیون پایه تهیه شد. اجزاء مورد استفاده در تولید نوشیدنی شامل: سترات سدیم (۰/۰۴۵ درصد)، سوربات پتاسیم (۰/۰۰۳ درصد)، بنزوات سدیم (۰/۰۰۵ درصد)، طعم دهنده Tutti frutti (۰/۰۲ درصد)، رنگ طبیعی کارامل (۰/۰۲ درصد)، ویتامین B<sub>1</sub> (۰/۰۰۲ درصد)، ویتامین B<sub>2</sub> (۰/۰۱۴ درصد)، ویتامین B<sub>5</sub> (۰/۰۰۰۲ درصد)، ویتامین B<sub>6</sub>

لندازه ذرات تا ۱ میلی‌متر پودر شد. پودر تولید شده از طریق الک مشبک فولادی زنگ نزن غربال شد. ذرات با حدود ۱ میلی‌متر انتخاب شد [۱۷]. جهت استخراج تانن از پوست انار از حلال آب و دستگاه اولتراسونیک (ZE 1031 DT, Heinrichstrabe, Germany) استفاده شد. نسبت نمونه به حلال روی ۱ به ۲۰ و دما برای روش فراصوت روی ۴۵ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. حدود ۳ گرم پودر پوست در بطری‌های ۱۲۵ میلی‌لیتری معرف جداگانه و ۶۰ میلی‌لیتر حلال به آن اضافه شد. بطری‌های معرف به مدت ۱ ساعت در حمام سونیکاتور قرار گرفتند. فیلتراسیون نمونه‌ها با کمک کاغذ صافی واتمن شماره ۴۱ انجام شد و سانتریفوژ (HB320, Brea, USA) به مدت حدود ۱۰-۱۲ دقیقه در ۵۰۰۰ دور در دقیقه انجام شد. حلال تحت خلاء ۱۴۰ میلی‌بار و دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد تا زمان خشک شدن تبخیر شد. عصاره‌ها در بطری‌های شیشه‌ای کهربایی رنگ جمع‌آوری شدند و در دمای ۶-۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال قرار گرفتند [۱۸].

**۲-۳- خشک کردن ترکیبات زیست فعال استخراج شده:** ترکیبات فعال زیستی پوست انار (به ویژه تانن) جدا شده، به روش غوطه‌وری در ۲۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد مخلوط شد. سپس مخلوط حاصل به مدت ۴ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و به صورت دستی تکان داده شد. در مرحله‌ی بعد عصاره اتانولی از کاغذ صافی واتمن شماره ۴ عبور داده شد. اتانول موجود در عصاره توسط تبخیر کننده‌ی چرخان (B-480, Flawil, Swiss) تحت خلاء در دمای ۳۵ درجه سلسیوس حذف گردید. برای فرایند خشک کردن تکمیلی عصاره تغلیظ شده، ابتدا عصاره تغلیظ شده با ۷۵ درصد مالتودکسترین مخلوط شده و توسط دستگاه خشک کن انجمادی (VACO5, ZIRBUS, Germany) به ترتیب در دمای ۴۰ درجه سلسیوس و فشار ۰/۱ مگا پاسگال خشک شد. سپس عصاره خشک شده در یک ظرف شیشه‌ای تیره رنگ

موج ۴۰۰-۴۰۰۰ cm<sup>-1</sup> با استفاده از دستگاه FTIR (IRSprit, Shimadzu, Japan) انجام گرفت. به منظور بررسی ایجاد برهمکنش‌های الکترواستاتیک بین کیتوزان و لیپوزوم و نیز ارزیابی درون پوشانی ترکیبات فعال زیستی از این دستگاه یعنی همان اسپکتروسکوپی انتقال فوری مادون قرمز FTIR استفاده شد [۲۰].

**۲-۶-۳- ویژگی ریخت شناسی (مورفولوژی) کیتوزم تولید شده:** ساختار میکروسکوپی ریزکپسول بهینه تولید شده، تک شکلی بودن یا چند شکلی بودن و اندازه ذرات با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی<sup>۷</sup> (EVO 15, ZEISS, Germany) در ۱۵ کیلووات مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور یک قطره از نمونه آماده شده بر روی لام آزمایشگاه ریخته شد و به مدت ۱ ساعت در دمای محیط خشک شد و سپس نمونه با استفاده از دستگاه کندوپاش یونی با لایه طلا پوشانده شد تا در زیر میکروسکوپ الکترونی مشاهده شود. این مراحل برای تست AFM بدون پوشش انجام شد. برای تست TEM، یک قطره از نمونه رقیق شده (۵ برابر با بافر فسفات ۷/۴) که بر روی یک شبکه مسی که شامل یک فیلم نگهدارنده است، قرار داده شد. نمونه با اسید فسفوتنگستیک<sup>۸</sup> به مدت ۵ دقیقه رنگ آمیزی شد. سپس مایع اضافی با استفاده از کاغذ صافی خارج شده و پس از خشک شدن مش، نمونه توسط TEM مورد بررسی قرار گرفت [۲۰].

#### ۲-۷-۲- آزمون‌های نویشدنی انرژی‌زا

**۲-۷-۱- آزمون pH و اسیدیته:** آزمون pH نمونه‌ها به کمک pH متر در دمای محیط و اسیدیته به روش تیتراسیون با هیدروکسید سدیم ۰/۱ نرمال تا ظهور رنگ صورتی کم‌رنگ پایدار انجام شد [۲۳].

**۲-۷-۲- آزمون کدورت:** برای ارزیابی کدورت، ابتدا به منظور یکسان نمودن غلظت عصاره، غلظت ماده خشک عصاره نهایی تا سطح (۴/۳ mg/l) رقیق گردید. میزان تغییر کدورت بعد از مدت ۲۴ ساعت به روش اسپکتروفتومتری (SpectroDirect, Lovibond, Germany) با اندازه‌گیری میزان

(۰/۰۰۰۴ درصد)، ساکارز (۸/۷ درصد)، اسید سیتریک (۰/۵۵ درصد)، مالتو دکسترین (۰/۰۶ درصد)، صمغ عربی (۰/۰۵ درصد)، تاورین (۰/۰۳۷ درصد)، گلوکونولاکتون (۰/۰۲۵ درصد)، کافئین (۰/۰۰۳ درصد) و مابقی فرمولاسیون را آب تشکیل می‌دهد. به منظور تولید نویشدنی حاوی ریزکپسول کیتوزوم، به حجم ۲۵۰ میلی‌لیتر فرمولاسیون پایه ۷۵/۵ گرم کیتوزوم افزوده شد [۲۱].

#### ۲-۶-۲- آزمون‌های کیتوزوم

**۲-۶-۱- تعیین پراکسید اسید لینولئیک:** مقدار ۵ گرم از هر نمونه اسید لینولئیک به همراه عصاره زیستی خشک شده بطور کامل در یک بشر ۵ میلی‌لیتری با ۰/۲ گرم هپتادکانوئیک اسید که به عنوان استاندارد داخلی اضافه شده بود، مخلوط شدند. ۲۰ میلی‌گرم از هر نمونه مخلوط حاصله در مجاورت هوا تحت هم زدن مداوم در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به ترتیب در ۰، ۱۲، ۱۴، ۱۶، ۱۸، ۲۰، ۲۲، ۲۸، ۳۵، ۴۴ و ۴۸ ساعت اکسید شدند. جهت تعیین پراکسید نمونه‌ها، مقدار ۵ گرم نمونه آماده شده در ارلن ملیر ۲۵۰ میلی‌لیتری وزن گردید و ۳۰ میلی‌لیتر حلال (مخلوط اسید استیک و کلروفرم) به آن اضافه شد. سپس حدود ۰/۵ میلی‌لیتر یدور پتاسیم به آن افزوده گردید و مخلوط به مدت یک دقیقه ساکن گذاشته و گاهی همزده شد، سپس حدود ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه گردید و مجدداً مخلوط به مدت یک دقیقه ساکن گذاشته شده و چند قطره چسب نشاسته به محلول اضافه و با محلول تیوسولفات ۰/۱ نرمال تیتراژ گردید. وقتی که رنگ نمونه به یک حالت شفاف و زلال رسید تیتراسیون متوقف گردیده و عدد پراکسید بر حسب میلی‌اکی والان بر کیلوگرم از طریق فرمول ۱ محاسبه شد [۲۲]:

$$\text{Proxied Value} = (1000 \times N \times V2) / (V1)$$

که در آن: N: نرمالیه تیوسولفات / V1: حجم تیتراسیون مصرفی / V2: حجم نمونه

**۲-۶-۲- آزمون تحلیل گروه‌های عاملی (تشکیل پیوند) با FTIR:** گروه‌های عاملی با اسپکتروسکوپی FTIR در طول

شد. به مدت ۳۰ ثانیه پس از ۳ دقیقه استراحت، ۰/۷۵ میلی‌لیتر کربنات سدیم ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) با غلظت ۲۰ درصد) به هر نمونه اضافه و حجم آن با افزودن آب مقطر به ۱۰ میلی‌لیتر تنظیم شد. در مرحله بعد، هر لوله از نمونه مجدداً در همان زمان هم زده شد و به مدت ۱ ساعت در انبار تاریک ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس جذب نمونه آزمایشی و سفید حاصل (حاوی ۰/۷۵ میلی‌لیتر آب مقطر، ۰/۷۵ میلی‌لیتر معرف Folin-Ciocalteu و ۰/۷۵ میلی‌لیتر  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ۲۰ درصد) توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (SpectroDirect, Lovibond, Germany) در ۷۲۵ nm اندازه‌گیری شد. فنل کل هر نمونه از منحنی استاندارد اسید گالیک (از ۲۵، ۵۰ تا ۱۰۰ میکروگرم بر گرم ترسیم شده) به دست آمد و به صورت میلی‌گرم GAE (معادل اسید گالیک) / گرم ماده خشک عصاره زیستی خشک شده بیان شد [۲۵].

۲-۸- تجزیه و تحلیل آماری: کلیه تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از این پژوهش با استفاده از نرم افزار SAS نسخه ۹/۴ انجام شد. همچنین، برای بررسی تفاوت بین نمونه‌ها از آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و آزمون توکی (Tukey) استفاده شد ( $p < 0.05$ ).

### ۳- نتایج و بحث

#### ۳-۱- پایداری اکسیداتیو اسید لینولئیک

نتایج پایداری اکسیداتیو اسید لینولئیک کنژوگه (CLA)<sup>۹</sup> حاوی غلظت‌های مختلف عصاره زیستی انار در شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج تأثیر معنادار غلظت‌های مختلف عصاره بر پایداری اکسیداتیو نمونه را نشان داد ( $p < 0.05$ ). مطابق انتظار بالاترین شاخص پراکسید (یعنی کمترین پایداری اکسیداتیو) در نمونه بدون عصاره زیستی انار مشاهده شد ( $p < 0.05$ ). افزودن عصاره‌ها سبب کاهش شاخص پراکسید (یعنی افزایش پایداری اکسیداتیو) نمونه‌ها شد ( $p < 0.05$ ). مطالعات نشان داده که CLA به طور کلی در هوا بسیار ناپایدار است. نتایج پایداری ایزومرهای CLA حداقل تا حدی توسط پیکربندی سیس یا ترانس آن، نه با موقعیت پیوندهای دوگانه آن‌ها، تعیین می‌شود. زیرا پیوند

جذب نور در طول موج ۸۰۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید [۲۰]:

۲-۷-۳- آزمون رنگ: شاخص‌های رنگی نمونه‌های انرژی‌زا فراسودمند با استفاده از دستگاه رنگ سنج (Hunter Lab, Colorflex EZ, USA) و شاخص‌های  $L^*$  (شاخص شفافیت-تیرگی)،  $a^*$  (شاخص قرمزی-سبزی) و  $b^*$  (شاخص زرد-آبی) تعیین شدند [۲۲].

۲-۷-۴- آزمون ویسکوزیته: ویژگی‌های رئولوژیکی نوشیدنی انرژی‌زای فراسودمند با استفاده از دستگاه ویسکومتر جریان موئینه (YR-1, Brookfield, USA) دمای ۵ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت. روش کار در ویسکومتر جریان موئینه بدین صورت است که زمان مورد نیاز برای عبور حجم استلنداردی از سیال از داخل لوله موئین‌های با طول معلوم اندازه‌گیری می‌گردد. ویسکوزیته نوشیدنی‌ها در دامنه دمایی ۳۰ تا ۸۰ درجه سانتی‌گراد با فواصل دمایی ۱۰ درجه سانتی‌گراد تعیین شد. سیال مرجع مورد استفاده در این پژوهش آب مقطر بود [۲۰]:

۲-۷-۵- آزمون دو فاز شدن: برای بررسی میزان دو فاز شدن، نمونه‌های نوشیدنی انرژی‌زا فراسودمند را در فالكون‌های ۵۰ میلی‌لیتری در بسته ریخته و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد طی مدت ۳۰ روز نگهداری شدند. برای محاسبه میزان دو فاز شدن نمونه‌ها میزان فاز بالایی توسط خط کش، اندازه‌گیری و بر کل مقدار نوشیدنی انرژی‌زا فراسودمند محتوی لوله تقسیم و در عدد ۱۰۰ ضرب شد [۲۴].

۲-۷-۶- آزمون فنل کل: ابتدا محلول استاندارد عصاره زیستی خشک شده (با غلظت ۱۰ mg/g) در متانول (خلوص ۹۶ درصد) در دمای اتاق تهیه شد. سپس از یک لوله فالكون ۱۰ میلی‌لیتری برای مخلوط کردن ۰/۷۵ میلی‌لیتر از محلول عصاره زیستی خشک شده با ۰/۷۵ میلی‌لیتر معرف Folin-Ciocalteu استفاده شد و مخلوط حاصل در حمام آب ۲۵ درجه سانتی‌گراد (شامل یک تکان دهنده رفت و برگشتی با ۲۵۰ دور در دقیقه) به هم زده

فنلی، CLA می‌تواند به راحتی یک الکترون یا یک هیدروژن را به دلیل جابجایی رزونانس اهدا کند، اما، بر خلاف آنتی‌اکسیدان‌های فنولی، رادیکال آزاد حد واسط آن ممکن است پایدار نباشد و در معرض تخریب اکسیداتیو بیشتر قرار گیرد. در واقع نشان داده شده، CLA به سرعت برای تشکیل اسیدهای چرب فوران تجزیه می‌شود [۳۰]. Carvalho Filho (۲۰۱۴)، حضور اسید لینولئیک کنژوگه در عصاره انار را نیز به عنوان یک عامل آنتی‌اکسیدانی معرفی کردند [۳۱]. با این حال مطالعات نشان داده که مانند آنتی‌اکسیدان‌های فنلی، CLA می‌تواند به راحتی یک الکترون یا یک هیدروژن را به دلیل جابجایی رزونانس اهدا کند، اما، بر خلاف آنتی‌اکسیدان‌های فنولی، حد واسط رادیکال آزاد آن ممکن است پایدار نباشد و در معرض تخریب اکسیداتیو بیشتر قرار گیرد. در واقع نشان داده شده، CLA به سرعت برای تشکیل اسیدهای چرب فوران تجزیه می‌شود [۳۲]. Shayanmehr و همکاران (۲۰۲۱) گزارش کردند که شرایط بهینه برای تولید فرآیند ایزومرهای CLA با پلیداری بالا عبارتند از: غلظت حلال ۶۷/۴ میلیلیتر، ده‌ای واکنش ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد و زمان واکنش ۱۴۰ دقیقه. در شرایط بهینه میزان ایزومرهای cis-9- و trans-10- به ترتیب برابر با ۸/۴۴ و ۷/۶۲ درصد بود [۳۳].

دوگانه سیس از نظر شیمیایی ناپایدارتر از پیوند ترانس دوگانه است زیرا اولی سطح انرژی آزاد بالاتری دارد و در برابر حمله اکسیژن آسیب پذیرتر است [۲۶]. پوست انار به دلیل ترکیبات شیمیایی و فعالیت‌های بیولوژیکی، یک ماده خام با ارزش است. حاوی ترکیبات فنلی مختلفی مانند آنتوسیانین‌ها، گالوتانین‌ها، اسیدهای هیدروکسی سینامیک، اسیدهای هیدروکسی بنزوئیک، الازیتانین‌ها و استرهای گالاژیل است. این ترکیبات فنلی مسئول فعالیت‌های بیولوژیکی مختلف پوست انار مانند آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی و آپوپتوز هستند [۲۷]. افزودن عصاره زیستی انار منجمد سبب کاهش شاخص پراکسید (یعنی افزایش پایداری اکسیداتیو) نمونه‌ها شد. این روند کاهش با افزایش غلظت عصاره زیستی انار معنادارتر بود. که می‌توان به حضور ترکیبات فنلی موجود در عصاره انار نسبت داده شود که با افزایش عصاره افزوده شده غلظت ترکیبات فنولی بیشتر می‌شود. یک همبستگی مثبت بین ترکیبات فنلی کل و فعالیت ضد رادیکالی وجود دارد [۲۸]. لازم به ذکر است از غلظت ۱۴۰۰ ppm به بالا در عصاره زیستی انار اختلاف آماری معناداری از نظر پایداری اکسایشی مشاهده نشد. علت این امر می‌تواند به دلیل پراکسیدانی عمل نمودن عصاره زیستی انار منجمد است [۲۹]. حضور اسید لینولئیک کنژوگه در عصاره انار را نیز به عنوان یک عامل آنتی‌اکسیدانی معرفی کردند. با این حال مطالعات نشان داده که مانند آنتی‌اکسیدان‌های

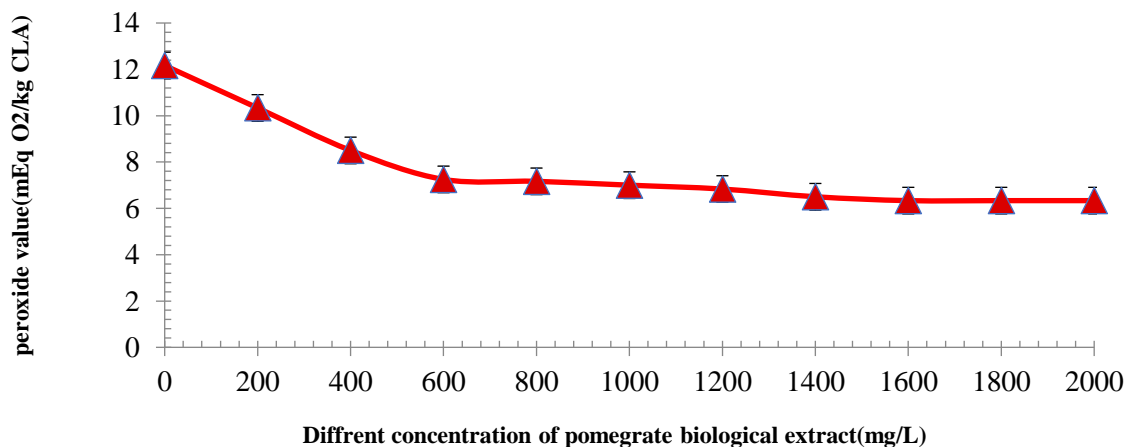


Fig 1. Results of linoleic acid peroxide index containing frozen pomegranate biological extract

همچنین پیک‌های ظاهر شده در عدد موج های  $1713 \text{ cm}^{-1}$  و  $1527 \text{ cm}^{-1}$  به ترتیب به ارتعاشات کششی پیوندهای  $\text{C}=\text{O}$  و  $\text{C}=\text{C}$  نسبت داده می‌شود. پیک‌های ظاهر شده در عدد موج‌های  $1713 \text{ cm}^{-1}$  و  $1527 \text{ cm}^{-1}$  به ترتیب به ارتعاشات کششی پیوندهای  $\text{C}=\text{O}$  و  $\text{C}=\text{C}$  نسبت داده می‌شود. پیک‌های پدیدار شده در عدد موج‌های  $1145 \text{ cm}^{-1}$  و  $954 \text{ cm}^{-1}$  نیز به ترتیب به ارتعاشات کششی پیوندهای  $\text{C}-\text{OH}$  و  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$  نسبت داده می‌شود. شکل‌های به ترتیب طیف‌های FTIR مربوط به نمونه‌های CLA و ترکیبات زیست فعال انار به ترتیب شکل ۲-c و شکل ۲-d نشان داد که در طیف مربوط به CLA پیک‌های واقع شده در عدد موج‌های حدود  $3500 \text{ cm}^{-1}$  و  $1617 \text{ cm}^{-1}$  و در طیف مربوط به نمونه ترکیبات زیست فعال انار پیک‌های واقع شده در عدد موج‌های  $3498 \text{ cm}^{-1}$  و  $1692 \text{ cm}^{-1}$  مجدداً به ترتیب مربوط به ارتعاشات کششی پیوند O-H موجود در ساختار هیدروکسیلی و ارتعاش کششی پیوند  $\text{C}=\text{O}$  در ساختار کربوکسیلی لینولنیک اسید است. همچنین پیک‌های واقع شده در عدد موج‌های  $2876 \text{ cm}^{-1}$  و  $2813 \text{ cm}^{-1}$  در نمونه CLA و پیک واقع شده در  $3018 \text{ cm}^{-1}$  در نمونه زیست فعال انار به ترتیب مربوط به ارتعاشات کششی نامتقارن و متقارن پیوندهای C-H و ارتعاش خمشی پیوند  $\text{C}=\text{C}$  در ساختار آلیفاتیک این اسید است. پیک‌های قرار گرفته در عدد موج‌های  $1336 \text{ cm}^{-1}$  و  $1352 \text{ cm}^{-1}$  به ترتیب در طیف‌های مربوط به نمونه CLA و زیست فعال انار مربوط به ارتعاش خمشی پیوند C-H است. پیک‌های قرار گرفته در عدد موج‌های  $1107 \text{ cm}^{-1}$  و  $1159 \text{ cm}^{-1}$  به ترتیب در طیف‌های مربوط به نمونه CLA و زیست فعال انار نیز مربوط به ارتعاش کششی پیوند C-OH است. پیک‌های واقع شده در عدد موج‌های  $680 \text{ cm}^{-1}$  و  $805 \text{ cm}^{-1}$  در نمونه CLA و همچنین  $693 \text{ cm}^{-1}$  و  $794 \text{ cm}^{-1}$  در نمونه زیست فعال انار نیز در هر دو نمونه مشترک بوده و مربوط به ارتعاشات رقاصکی  $10$  و گهواره‌ای  $11$  پیوندهای C-H در ساختار آلیفاتیک این اسید چرب است. بنابراین

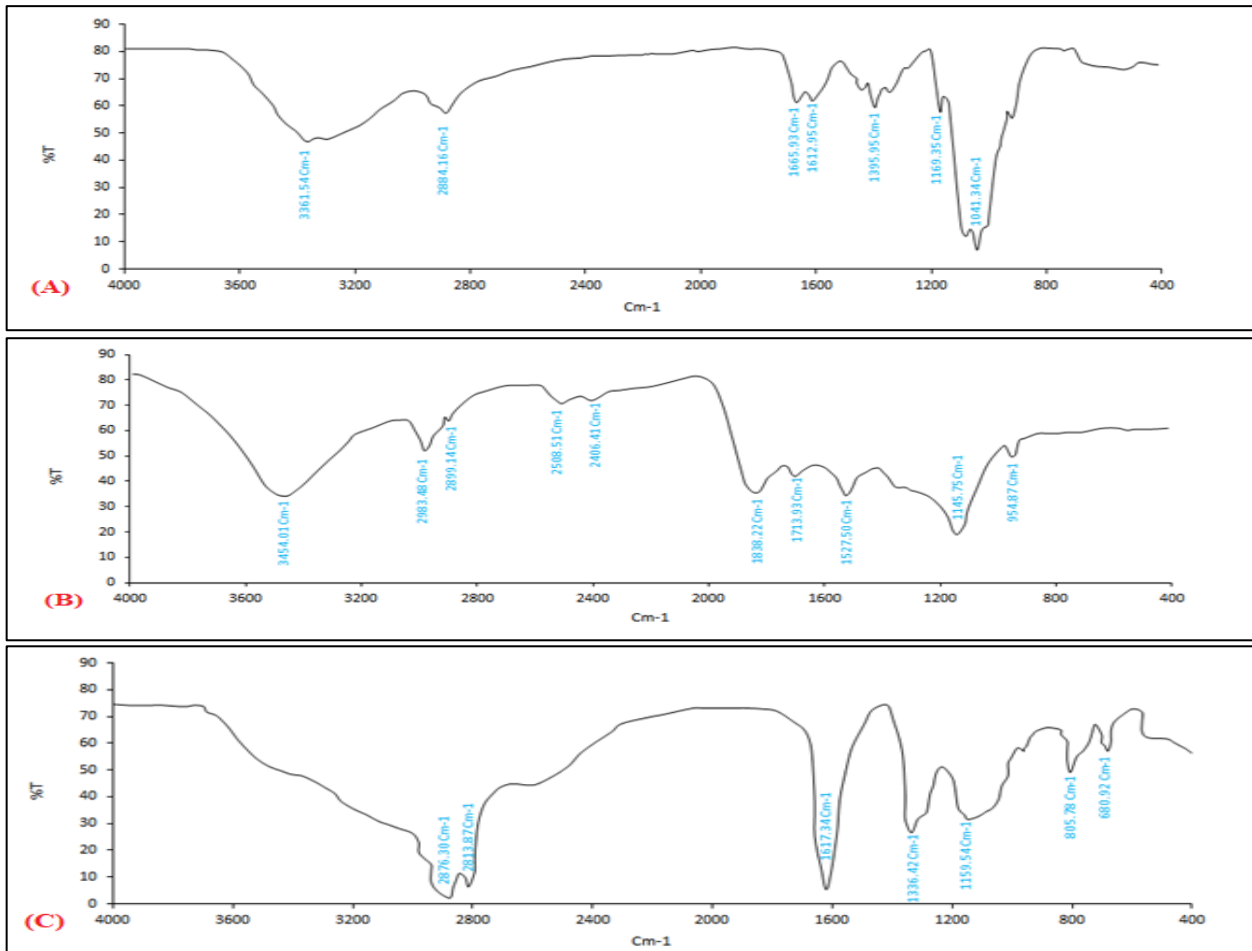
### ۳-۲- تحلیل گروه‌های عاملی (تشکیل پیوند) با FTIR

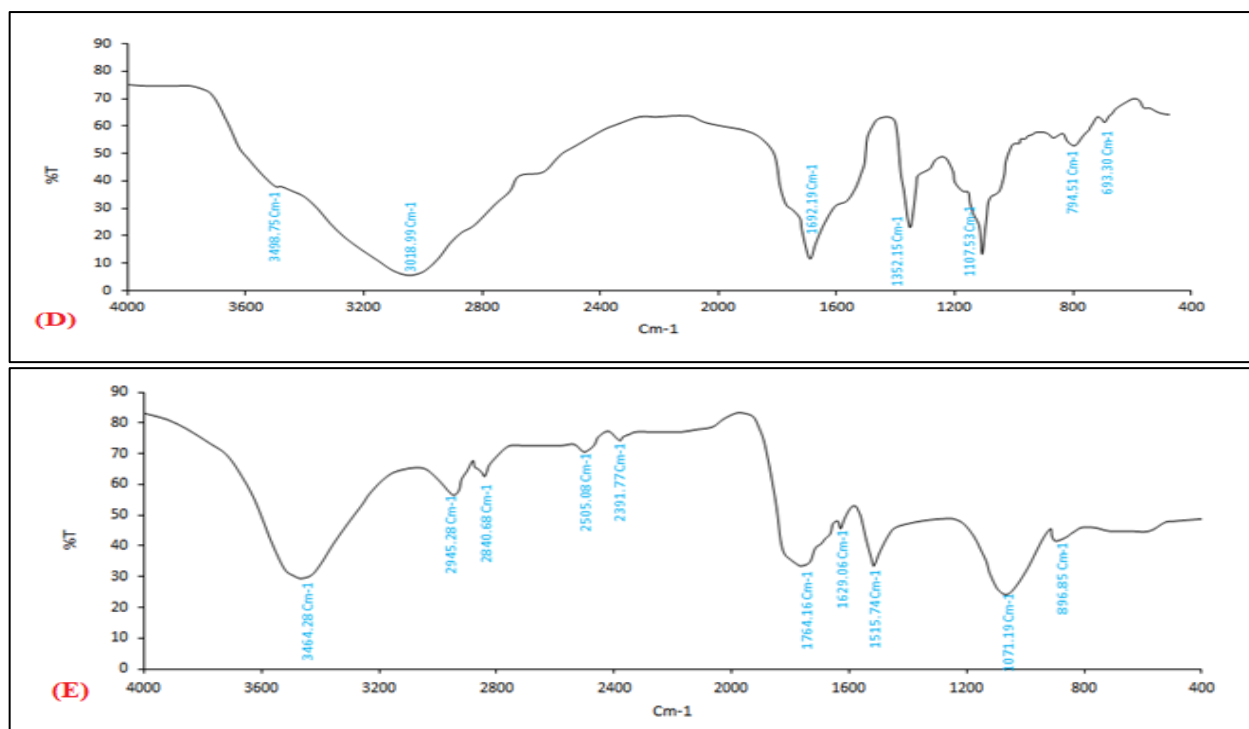
در طیف سنجی FTIR انرژی‌های پرتو مادون قرمز با انرژی‌های ارتعاشی مولکول‌ها منطبق می‌شوند و این انطباق باعث جذب انرژی اشعه الکترومغناطیس توسط نمونه می‌شوند. بنابراین با تغییر فرکانس اشعه در محدوده‌ای مشخص (مادون قرمز) طیفی بدست می‌آید که در برخی از طول موج‌ها مقدار عبور آن کاهش یافته و یا به عبارت بهتر توسط مولکول‌های ماده جذب شده است. بنابراین با بررسی فرکانس جذب هر طیف می‌توان به پیوندهای موجود در آن ماده پی‌برد. برای تحلیل گروه‌های عاملی این تحقیق از مطالعات Shahmoradi و همکاران (۲۰۲۳)، Nandiyanto و همکاران (۲۰۱۹)، Jung و همکاران (۲۰۱۸) و Gholizadeh و همکاران (۲۰۲۰)، استفاده شد [۳۴، ۳۵، ۳۶ و ۳۷] در طیف FTIR مربوط به نمونه کیتوزان (شکل ۲-a)، پیک ایجاد شده در عدد موج  $3361 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاشات کششی پیوندهای O-H و N-H در ساختارهای هیدروکسیلی و آمیدی می‌باشد. پیک قرار گرفته در عدد موج  $1646 \text{ cm}^{-1}$  و  $1612 \text{ cm}^{-1}$  نیز مربوط به ارتعاشات خمشی همین پیوندها است و پیک مربوط به ارتعاش کششی و خمشی C-H به ترتیب در عدد موج‌های  $2884$  و  $1395 \text{ cm}^{-1}$  قرار گرفته است. همچنین پیک‌های ظاهر شده در عدد موج‌های  $1163 \text{ cm}^{-1}$  و  $1041 \text{ cm}^{-1}$  به ترتیب مربوط به ارتعاشات کششی پیوندهای C-N و C-O می‌باشد. شکل طیف FTIR مربوط به نمونه انار (شکل ۲-b)، نشان داد که در طیف FTIR مربوط به نمونه انار، پیک پدیدار شده در عدد موج  $3454 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاشات کششی پیوند O-H و پیک‌های ظاهر شده در عدد موج‌های  $2983 \text{ cm}^{-1}$  و  $2899 \text{ cm}^{-1}$  به ترتیب مربوط به ارتعاشات کششی نامتقارن و متقارن پیوند C-H در ساختار آلیفاتیک ماده است. پیک‌های مربوط به ارتعاشات گروه‌های آلکنی، کربونیلی و لاکتونی به ترتیب در عدد موج‌های  $2508$ ،  $2406 \text{ cm}^{-1}$  و  $1838 \text{ cm}^{-1}$  قرار گرفته است.



کربوکسیلی به ترتیب در عدد موج‌های  $2505\text{ cm}^{-1}$ ،  $2391\text{ cm}^{-1}$  و  $1764\text{ cm}^{-1}$  قرار گرفته است که در طیف مربوط به انار نیز مشاهده شده بود. پیک‌های قرار گرفته در عدد موج‌های  $1629\text{ cm}^{-1}$  و  $1515\text{ cm}^{-1}$  نیز به ترتیب مربوط به ارتعاشات خمشی پیوندهای O-H و N-H موجود در ساختار کیتوزان است. همچنین پیک‌های قرار گرفته در عدد موج‌های  $1071\text{ cm}^{-1}$  و  $896\text{ cm}^{-1}$  نیز به ترتیب مربوط به ارتعاش کششی پیوند C-O و ارتعاشات رفاصکی پیوند C-H است که در ساختارهای لینولینیک اسید و تانن موجود در زیست فعال انار موجود است. بنابراین وجود ساختارهای موجود در زیست فعال انار در کنار کیتوزان در این کامپوزیت قابل اثبات می‌باشد.

وجود این اشتراکات در هر دو طیف بیانگر برهمکنش موفقیت آمیز اسید لینولیک با ترکیبات زیست فعال انار است. جهت بررسی صحت تشکیل کیتوزوم از آزمون FTIR استفاده شده و طیف حاصل مشاهده شد که در طیف FTIR مربوط به نمونه کیتوزوم (شکل ۲-e)، پیک ظاهر شده در عدد موج  $3464\text{ cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاش کششی پیوندهای O-H و N-H است که در ساختار کیتوزان و ترکیبات زیست فعال موجود در انار موجود است. پیک‌های ظاهر شده در عدد موج‌های  $2945\text{ cm}^{-1}$  و  $2840\text{ cm}^{-1}$  به ترتیب مربوط به ارتعاشات کششی نامتقارن و متقارن پیوند C-H در ساختار آلیفاتیک لینولینیک اسید و دیگر ساختارهای موجود در زیست فعال انار و کیتوزان است. پیک‌های مربوط به ارتعاشات گروه‌های آلکنی، کربونیلی و





**Fig 2. FTIR spectrum and approximate areas of different identified functional groups (A): Chitosan sample/ (B): Pomegranate sample/ (C): Linoleic acid/ (D): Pomegranate aqueous extract/ (E): Chitosome**

نانوکیتوزوم‌ها نامنظم بود که می‌تواند مربوط به حضور کیتوزان جذب شده روی سطح ترکیبات زیست فعال بستگی داشته باشد. علاوه بر این، کیتوزان آزاد ممکن است در طول فرآیند خشک کردن تجمعاتی تشکیل دهد. کیتوزان آزاد می‌تواند باعث ایجاد تعادل دینامیکی بین «شکل تجمع» پلیمر زیستی و «شکل جذب‌شده» آن در اطراف ترکیبات زیست فعال شود. در واقع، کیتوزان خود به خود تجمع می‌یابد، بنابراین وقتی در محلول آبی رقیق می‌شود، نانو و ریزذرات می‌سازد، و فرآیند تجمع آن به شدت به وزن مولکولی کیتوزان و درجه استیل‌شدن بستگی دارد [۳۹]. نتایج بدست آمده با نتایج Nerli و همکاران (۲۰۲۳) مطابقت داشت. آن‌ها طی بررسی مورفولوژی کیتوزوم‌های پوشش‌ده شده با کیتوزان شکل کروی کیتوزان‌ها و همگن و اندازه نانومتری آن‌ها را گزارش کردند [۴۰]. Hashemi و همکاران (۲۰۲۰) نشان دادند کیتوزوم‌های حاوی لینولئیک اسید حاوی لینولئیک اسید، اندازه کوچک ذرات کروی و همگن با سطح صاف را گزارش کردند [۴۱].

### ۳-۳- ویژگی ریخت‌شناسی<sup>۱۲</sup>

ریخت‌شناسی عصاره خشک شده پوست انار به روش تصعیدی (شکل ۳)، نشان داد استفاده از امواج اولتراسونیک سبب تشکیل لندازه ذرات کوچک در حد نانومتر (بین محدوده ۴۸/۵۸۱ تا ۶۲/۲۱۴) شد. همچنین شکل شیشه مانند آمورف مشخصه ویژگی خشک کن انجمادی است در سطح عصاره‌ها مشاهده شد. عصاره ضایعات زیستی انار خشک شده منجمد فرم‌های پولکی با سطوح صاف را نشان دادند. نتایج Febriyenti و همکاران (۲۰۱۴) نیز نشان دادند عصاره Haruan خشک شده با انجماد سطح صاف و مناطق آمورف پولکی داشتند [۳۸]. ورفولوژی کیتوزم نهایی تولید شده در شکل ۴ نشان داده شده است. وجود ذرات تقریباً کروی با اندازه نانومتری (۷۷/۶۶ و ۷۹/۹۰) را نشان داد. همچنین یکنواختی مشاهده شده در اندازه ذرات، توزیع مناسب اندازه ذرات را تأیید می‌کند. همچنین یکپارچگی در سیستم‌های نانوحامل، بدون وقوع جداسازی فاز، تجمع در نانوحامل‌ها مشاهده شد و نتایج نشان داد شکل

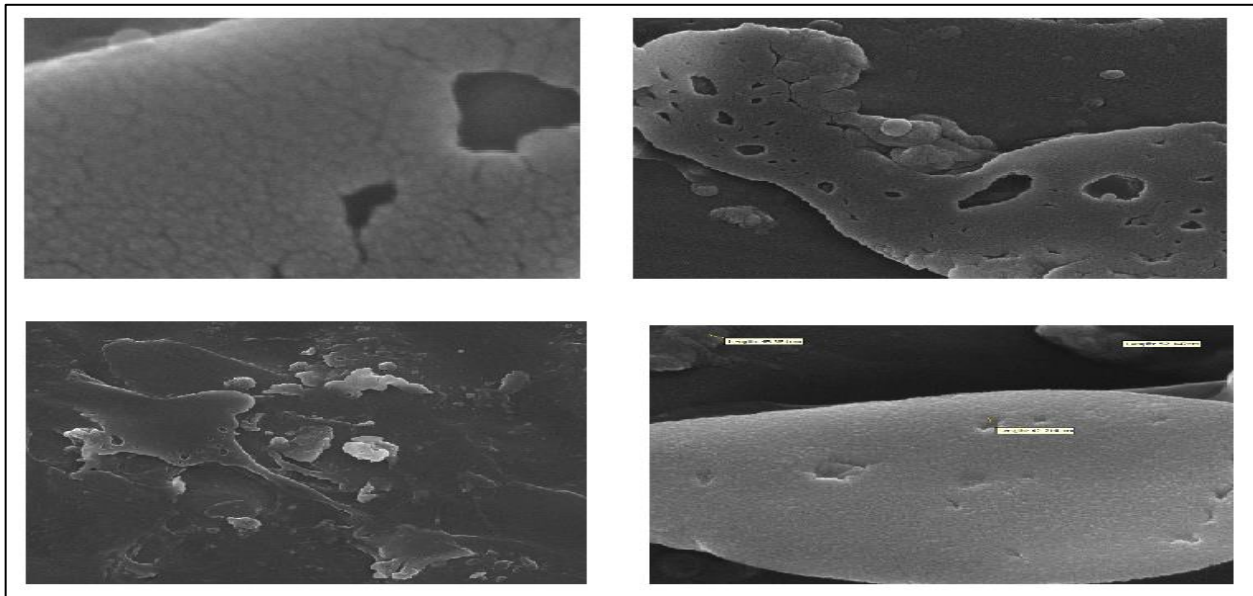


Fig 3. Morphology of dried pomegranate peel extract by sublimation method

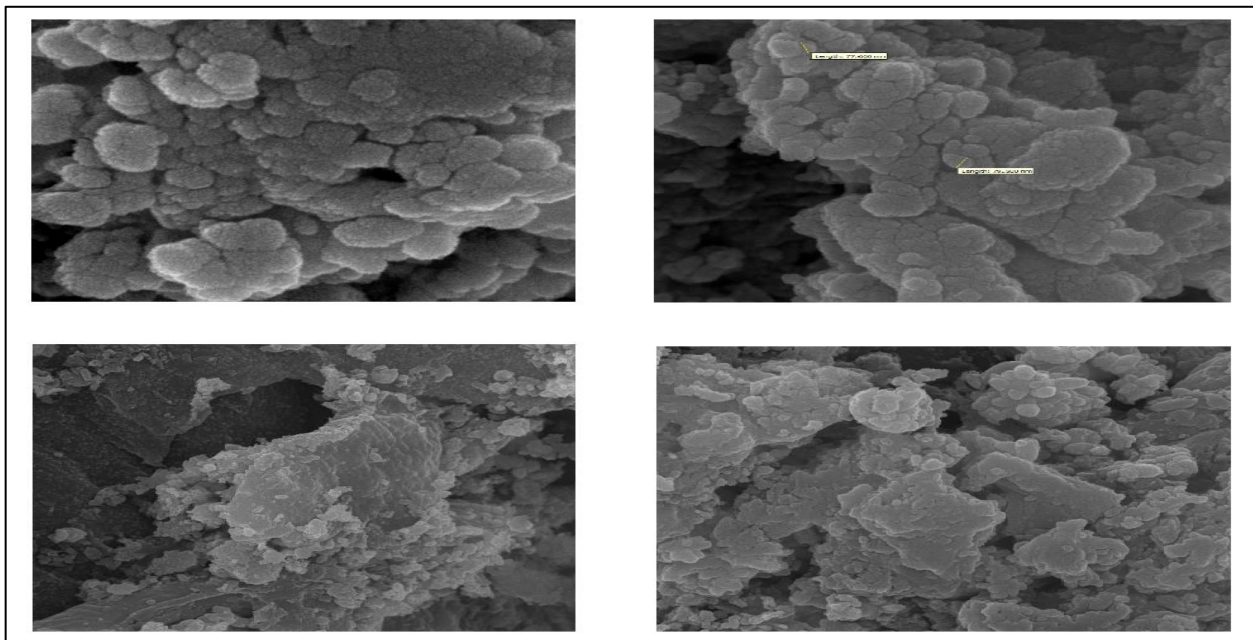


Figure 4- Morphology of produced chitosome

میکروارگانسیم‌ها و ماندگاری محصولات دارد زیرا می‌تواند مستقیماً بر ویژگی‌های حسی نوشیدنی‌ها تأثیر بگذارد [۴۲]. در جدول ۱ میزان pH و اسیدیته نوشیدنی‌های انرژی‌زا را نشان می‌دهند. مطابق با نتایج افزودن کیتوزم‌های تولید شده سبب افزایش معنادار pH (یا کاهش معنادار اسیدیته) نوشیدنی‌ها در مقایسه با نمونه شاهد شد. با این حال روند طی ۴۵ روز نگهداری کاهش معنادار pH (یا افزایش معنادار اسیدیته) در دو گروه مورد بررسی گزارش شد. مطالعات نشان داده که کاهش میزان pH در نمونه‌های نوشیدنی

۳-۵- ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نوشیدنی انرژی‌زا  
فرا سودمند

۳-۵-۱- pH و اسیدیته

نوشیدنی‌های انرژی‌زا، نوشیدنی‌هایی هستند که در محتوای خود به غیر از کالری، کافئین در ترکیب با سایر ترکیبات احتمالی افزایش دهنده انرژی مانند عصاره‌های گیاهی، ویتامین‌های گروه B نیز دارند. مطالعات نشان داده که pH نقش مهمی در تولید کارآمد، کنترل کیفیت، رشد

این مطالعه طی بررسی ویژگی‌های نوشیدنی انرژی‌زای خرما تحت تیمار با امواج فراصوت را نشان دادند [۴۲]. Selahvarzi و همکاران (۲۰۲۱) نیز نشان دادند عصاره دانه انار در نوشیدنی‌های کافئین‌دار سبب کاهش pH و افزایش اسیدیته نوشیدنی‌ها شد [۴۵].

انرژی‌زا می‌تواند به دلیل تشکیل محصولات اسیدی حاصل از واکنش میلارد و رشد میکروبی در حین انبارمانی باشد [۴۳]. کمتر بودن pH (بالاتر بودن اسیدیته) نمونه‌های غنی‌شده با کیتوزم‌ها را می‌توان به اسیدیته لینولئیک اسید و عصاره انار نسبت داد که می‌تواند به به افزایش آزادسازی یون‌های هیدروژن در طی ذخیره‌سازی طولانی مدت نسبت داده شود [۴۴]. Fikry و همکاران (۲۰۲۳)، نیز روند ماشبه

**Table 1- The results of the physicochemical characteristics of the functional energy drink during 45 days**

parameter	Treatment	Shelf-life (Day)	
		1Day	45 Day
PH	Control	3.81 ± 0.00 <sup>Aa</sup>	3.45 ± 0.00 <sup>Bb</sup>
	Contain chitosome	3.30 ± 0.00 <sup>Ab</sup>	3.51 ± 0.03 <sup>Ba</sup>
Acidity	Control	0.55 ± 0.00 <sup>Ba</sup>	0.71 ± 0.00 <sup>Aa</sup>
	Contain chitosome	0.50 ± 0.00 <sup>Bb</sup>	0.69 ± 0.01 <sup>Ab</sup>

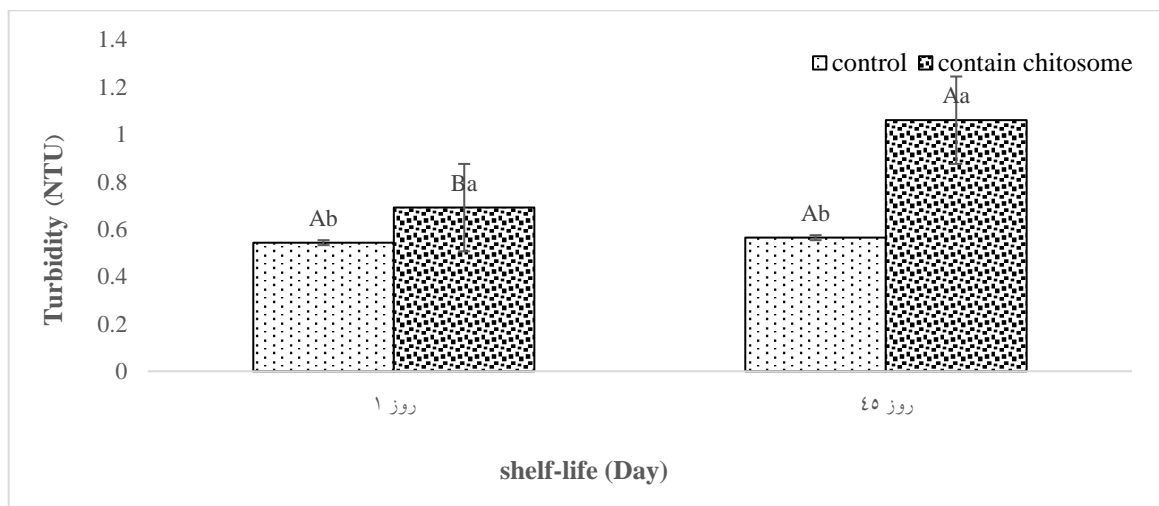
\*Different lowercase letters indicate significant differences between treatments ( $p < 0.05$ ).

\*Different capital letters indicate significant differences between days ( $p < 0.05$ ).

کدورت در این نمونه‌ها طی ۴۵ روز نگهداری مشاهده شد. این افزایش کدورت می‌تواند به دلیل رهائش ترکیبات از ساختار کیتوزم باشد. این بدان معنی است که کیتوزان یک عامل منعقد کننده / لخته‌ساز کارآمد برای شفاف کردن نوشیدنی‌ها است [۴۷]. در این راستا، مختاریان و همکاران [۱۹] نشان دادند که برهمکنش کافئین- پلی فنول یک عامل اصلی در تشکیل کرم چای سبز بوده که با افزایش ظاهر آبری در عصاره همراه است. کشک‌سرا و همکاران (۲۰۲۳) طی بررسی تولید نوشیدنی عملگرا برپایه ترکیبات زیست فعال چای سبز و قهوه سبز درهم تنیده در ساختار کیتوزوم نیز نتایج مشابه این تحقیق را نشان دادند [۲۵].

### ۳-۵-۲- کدورت

یکی از مهمترین فاکتورهای مؤثر در استفاده از نانوحامل‌های کلئیدی برای غنی‌سازی انواع غذایی و بخصوص نوشیدنی‌های شفاف، بررسی میزان کدورت نانوحامل است. کدورت توسط مقادیر نور پخش‌شده توسط ذرات موجود در محیط سوسپانسیون تعیین می‌شود و به ماهیت، تعداد، اندازه کلئیدی ذرات موجود در فاز مایع و تفاوت در ضریب انعکاس ذرات و محیط سوسپانسیون و توزیع اندازه ذرات بستگی دارد [۴۶]. نتایج میزان کدورت نوشیدنی‌های انرژی‌زا نشان داد (شکل ۵) افزودن کیتوزوم در نوشیدنی‌ها سبب افزایش معنادار میزان کدورت در مقایسه با نمونه شاهد شد. همچنین روند افزایشی معنادار

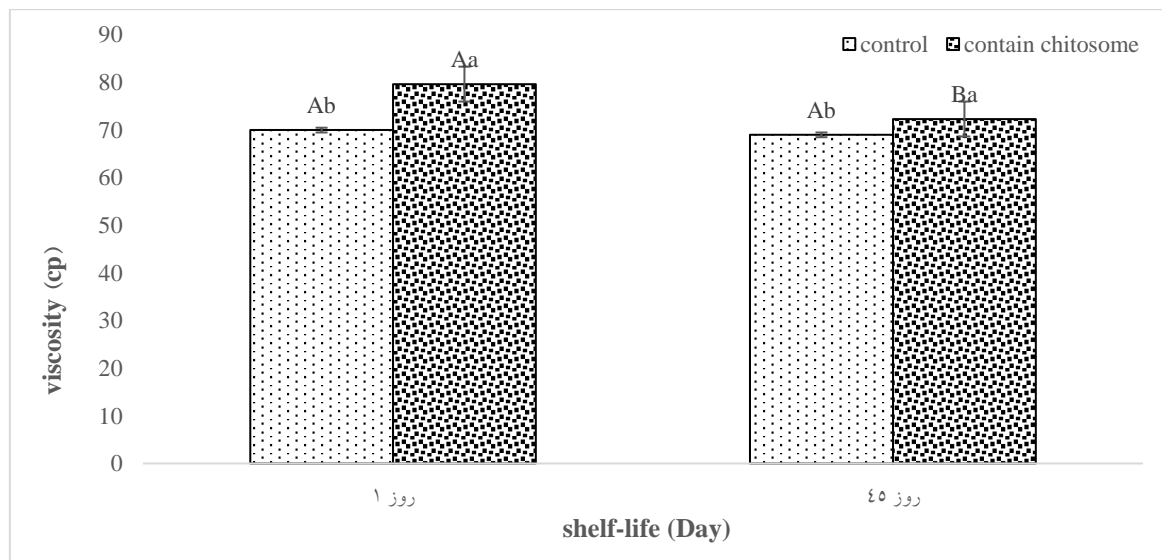


**Fig 5. The results turbidity in the energy drink during 45 days**\*Different lowercase letters indicate significant differences between treatments ( $p < 0.05$ ).\*Different capital letters indicate significant differences between days ( $p < 0.05$ ).

بین زنجیره‌ها می‌شود که در افزایش ویسکوزیته نوشیدنی آشکار می‌شود [۴۲]. زنده‌بودی و همکاران (۲۰۱۹) نتایج مشابهی طی تولید نوشیدنی انرژی‌زا حاوی هیدروکلونید زانتان و عصاره خرما نشان دادند [۴۹]. Elkot و همکاران (۲۰۲۴) نیز افزایش ویسکوزیته نوشیدنی انرژی‌زای ورزشی غنی شده با رز جلبک *اسپیروولینا پلاتنتیس*<sup>۳</sup> نشان دادند [۵۰].

**۳-۵-۳- ویسکوزیته**

نتایج میزان ویسکوزیته نوشیدنی‌های انرژی‌زا (شکل ۶) نشان داد افزودن کیتوزوم‌ها افزایش معنادار میزان ویسکوزیته نوشیدنی‌ها در نمونه نوشیدنی انرژی‌زا طی زمان نگهداری مشاهده شد. این افزایش ویسکوزیته می‌تواند ناشی از نشت کیتوزوم‌های موجود در نوشیدنی‌ها در حین زمان انبارمانی باشد. این امر احتمالاً به دلیل وجود گروه‌های کربوکسیل بارهای منفی تولید می‌کنند که منجر به دافعه الکترواستاتیکی

**Fig 6. The results viscosity in the energy drink during 45 days**\*Different lowercase letters indicate significant differences between treatments ( $p < 0.05$ ).\*Different capital letters indicate significant differences between days ( $p < 0.05$ ).

ادغام و زیکول‌های بی‌ثبات شده تکه تکه شدند [۵۱]. مطالعات نشان داده پوشش سطحی نانولیپوزوم‌ها یکی از راه‌حل‌های کارآمد برای بهبود پایداری نانولیپوزوم‌ها و افزایش زمان ماندن ترکیبات محصورشده در داخل نانو حامل هاست که برای افزایش کیفیت محصولات غذایی فرموله شده بسیار مورد توجه است Katouzian و همکاران (۲۰۲۱)، علت کاهش پایداری لیپوزوم‌ها را عصاره بارگذاری شده درون کیتوزوم‌ها گزارش کردند که ممکن است به فرآیند استولدد کمک کند که در آن گروه‌های هیدروکسیل موجود در عصاره به گروه‌های حاوی O با بار منفی تغییر می‌یابند که به نوبه خود یونی/ هیدروژن را

**۳-۵-۳- دوفاز شدن**

نتایج میزان دوفاز شدن نوشیدنی‌های انرژی‌زا (شکل ۷) نشان دادند افزودن کیتوزوم تولید شده سبب افزایش معنادار میزان دوفاز شدن نوشیدنی‌ها در مقایسه با نمونه شاهد شد. درحالی‌که هیچ دوفاز شدنی در نمونه‌های شاهد مشاهده نشد. نتایج نشان دهنده ناپایداری کیتوزوم‌ها در طول زمان است. این نتایج را می‌توان به‌عنوان پیامد شکستگی لیپوزوم‌های فراصوتی توضیح داد که در غیاب یک محافظ انجمادی خشک شده بودند، بنابراین، ساختارهای ضعیفی را ایجاد می‌کردند که در طول زمان و در نتیجه تجمع و

می‌توان به دافعه الکترواستاتیکی بین کیتوزوم‌های دارای بار مثبت و تمایل کم نانوذرات به رسوب به دلیل کاهش وزن مولکولی آن‌ها نسبت داد [۵۲]. Peng و همکاران (۲۰۱۸)، نیز نشان دادند هنگامیکه نانوحامل‌ها در مواد غذایی و نوشیدنی‌ها استفاده می‌شوند، ممکن است واکنش‌های تداخلی را در بین اجزای غذا تحریک کنند. علاوه بر این، نشست مواد هسته و همچنین تجمع می‌تواند در طول زمان ذخیره‌سازی رخ دهد و باعث کاهش کیفیت ماتریس مواد غذایی شود [۵۳].

تشکیل می‌دهند. با گروه‌های دارای بار مثبت قسمت سر فسفولیپیدها متصل می‌شود که منجر به فرآیند رسیدن استوالد می‌شود. یک توضیح احتمالی برای تقویت پایداری ممکن است تشکیل یک سد با بار مثبت توسط کیتوزان بر روی نانولیپوزوم‌ها باشد که هم پایداری اکسیداتیو و هم پایداری فیزیکی شبکه را افزایش می‌دهد. این واقعیت تشکیل رادیکال‌های آزاد را محدود می‌کند و در نتیجه از تخریب فسفولیپیدها جلوگیری می‌کند. علت دیگر ناپایداری کیتوزوم‌ها را می‌توان به اندازه نانو ذرات حاصل شده نسبت داد در هنگام تشکیل نانوذرات با قطر کم به تشکیل یک شبکه نسبتاً همگن می‌گردد در نتیجه، افزایش پایداری را

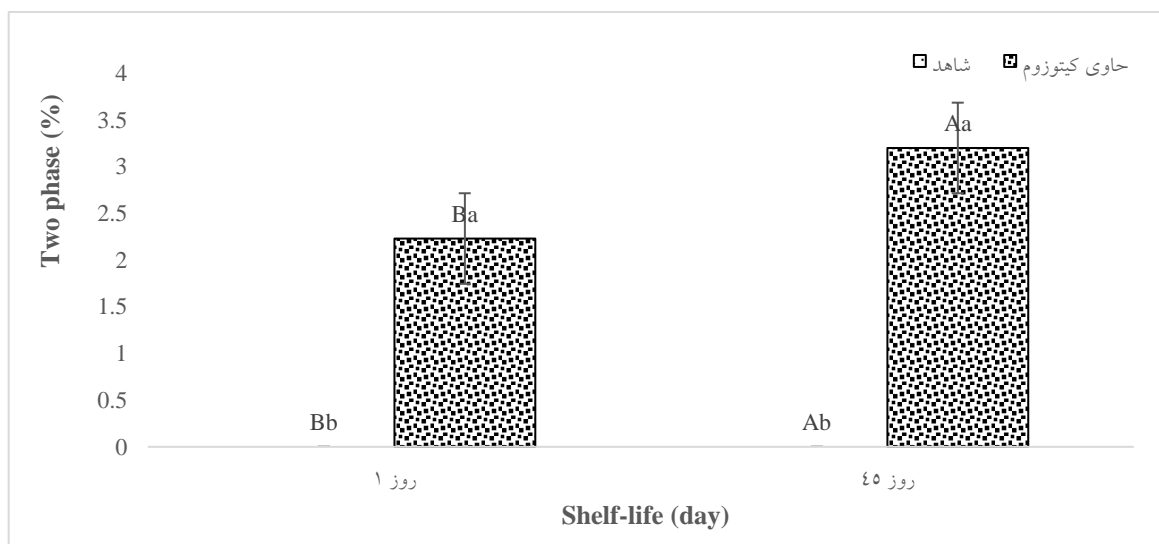


Fig 7. The results of two phase in the energy drink during 45 days

\*Different lowercase letters indicate significant differences between treatments ( $p < 0.05$ ).

\*Different capital letters indicate significant differences between days ( $p < 0.05$ ).

پوست لنار به عنوان ماده موثره بر رنگ نوشیدنی یعنی آنتوسیانین‌های عصاره باشد که این امر را می‌توان با اثر بازدارندگی آن‌ها بر روی آنزیم‌ها، به ویژه بر روی O-دیفنول اکسیداز توضیح داد [۵۴]. همچنین نتایج نشان داد طی ۴۵ روز نگهداری تغییرات رنگ در نمونه نوشیدنی انرژی‌زای حاوی کیتوزم بطور معناداری بالاتر بود. Sami و همکاران (۲۰۲۱) نیز نتایج مشابهی طی افزودن عصاره پوست انار بر رنگ شیر نشان دادند [۵۴]. افزایش زردی نوشیدنی‌های انرژی‌زا فراسودمند طی ۴۵ روز نگهداری نیز مشاهده شد

### ۳-۶- رنگ

شاخص رنگ یکی از مهمترین پارامترها در پذیرش محصول توسط مصرف کننده است. نتایج شاخص روشنایی نمونه‌های نوشیدنی انرژی‌زا (جدول ۲) نشان دهنده کاهش میزان روشنایی نمونه‌ها با افزودن کیتوزم بود که می‌تواند به دلیل رنگ زرد لستین سویای استفاده شده در این محصولات باشد. این کاهش شاخص روشنایی در طول زمان می‌تواند به دلیل دما و نور محیط باشد که اجزای مرتبط با رنگ نوشیدنی، معمولاً فلاونوئیدها را تخریب می‌کند. افزایش شاخص قرمزی می‌تواند به دلیل رنگ عصاره

Table 2- The results of the color value of the functional energy drink during 45 days

parameter	Treatment	Shelf-life (Day)	
		1 Day	45 Day
L*	Control	54.43 ± 0.25 <sup>Aa</sup>	53.89 ± 0.16 <sup>Ba</sup>
	Contain chitosome	52.54 ± 0.32 <sup>Ab</sup>	51.38 ± 0.05 <sup>ABa</sup>
a*	Control	14.88 ± 0.02 <sup>Ba</sup>	15.12 ± 0.09 <sup>Aa</sup>
	Contain chitosome	13.10 ± 0.07 <sup>Bb</sup>	15.469 ± 0.30 <sup>Ab</sup>
b*	Control	16.56 ± 0.04 <sup>Ba</sup>	17.04 ± 0.10 <sup>Ab</sup>
	Contain chitosome	15.77 ± 0.04 <sup>Bb</sup>	17.70 ± 0.23 <sup>Aa</sup>
ΔE	Control	0.00 ± 0.00 <sup>Ba</sup>	0.75 ± 0.27 <sup>Ab</sup>
	Contain chitosome	0.00 ± 0.00 <sup>Bb</sup>	3.26 ± 0.38 <sup>Aa</sup>

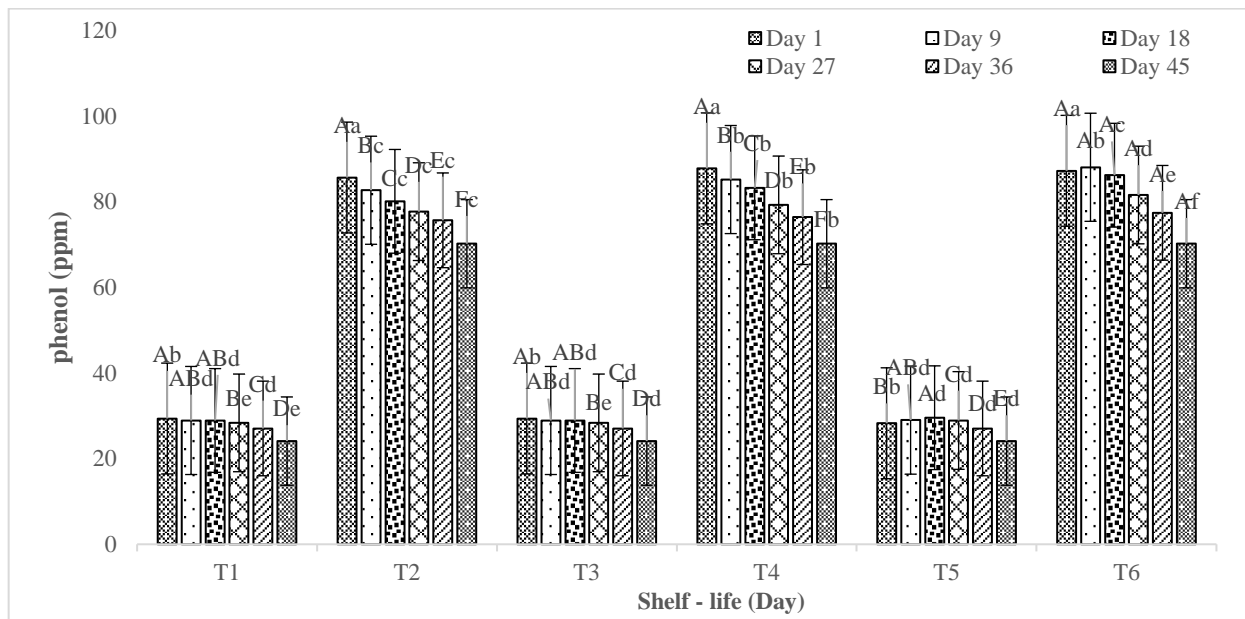
\*Different lowercase letters indicate significant differences between treatments ( $p < 0.05$ ).

\*Different capital letters indicate significant differences between days ( $p < 0.05$ ).

در نمونه‌های نگهداری شده در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد. همچنین نتایج نشان داد در تمام گروه‌های مورد بررسی، محتوی فنلی طی ۴۵ روز نگهداری کاهش یافت. احتمالاً این حلت به دلیل تخریب ترکیبات پلی‌فنولی رهائش یافته در محیط نوشیدنی و اثرات تخریبی شرایط نگهداری محیطی می‌باشد [۵۸]. همراستا با نتایج بدست آمده، Seyedabadi و همکاران (۲۰۲۱)، طی بررسی میزان رهائش کافئین در ۳۷ درجه سانتی‌گراد از کیتوزوم در محیط شبیه‌سازی شده آرمیوه نشان دادند که رهائش ناگهانی کافئین از ساختار کیتوزوم در محیط شبیه‌سازی شده آرمیوه، به دلیل متورم شدن ساختار ناشی از نفوذ محیط شبیه‌ساز و متعاقباً رهائش کافئین سطح نانو ذرات است [۲۰]. همچنین Liu و همکاران (۲۰۱۷) طی بررسی رهائش نانوذرات کیتوزان حاوی پلی‌فنول‌های چای مخلوط شده با فیلم ژلاتین در محیط‌های شبیه‌ساز چربی ۵۰ و ۹۵ درصد اتانول نشان دادند که رهائش ترکیبات پلی‌فنولی در محیط ۵۰ درصد نسبت به محیط ۹۵ درصد به دلیل افزایش دو برابری ضریب نفوذ، سریعتر بود [۵۹].

### ۳-۷- نتایج فنل کل

ترکیبات زیست‌فعال (شامل کاروتنوئیدها، اسانس‌های روغنی، آنتی‌اکسیدان‌ها یا طعم‌دهنده‌ها) گروهی از مواد شیمیایی با ویژگی‌های سلامتی‌بخش، دارویی و تغذیه‌ای بوده که به‌طور گسترده‌ای در فرآورده‌های غذایی به‌منظور ارتقاء ویژگی‌های حسی یا توسعه خصوصیات غذا دارویی آن‌ها به‌کار می‌رود [۵۵]. مطابق نتایج ارائه شده در شکل ۸ مدت زمان و درجه حرارت نگهداری تأثیر معناداری بر محتوی فنل نمونه‌ها نشان داد. بالاترین میزان ترکیبات فنولی کل (متناظر با بیشترین نرخ رهائش ترکیبات فنولی) موجود در محیط نوشیدنی، در نوشیدنی‌های نگهداری شده در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد طی ۴۵ روز نگهداری مشاهده شد. این امر احتمالاً این حلت به دلیل کاهش مقاومت دیواره کیتوزوم (متناظر با کاهش سیالیت غشاء) و در نتیجه رهائش ترکیبات فنولی می‌باشد [۲۰]. همچنین نتایج محتوی کل نمونه‌های نوشیدنی نگهداری شده در دماهای ۵ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد نشان داد کمترین محتوی فنلی در نمونه نگهداری شده در دمای ۵ درجه و بعد از آن



**Fig 9. The results of phenol in the energy drink during 45 days**

\*T1: control sample kept at 5°C/ T1: sample containing chitosome kept at 5°C/ T3: control sample kept at 25°C/ T4: sample containing chitosome kept at a temperature of 25°C/ T5: control sample kept at a temperature of 45°C/ T6: a sample containing chitosome kept at a temperature of 45°C

\*Different lowercase letters indicate significant differences between treatments ( $p < 0.05$ ).

\*Different capital letters indicate significant differences between days ( $p < 0.05$ ).

۷۹/۹۰) با یکنواختی مشاهده شده در اندازه ذرات، توزیع

مناسب لندازه ذرات را تأیید می‌کند. طی بررسی نتایج نوشیدنی‌های انرژی‌زا فراسودمند، افزایش معنادار pH (یا کاهش معنادار اسیدیته) با افزودن نانو کیتوزوم‌ها، افزایش معنادار ویسکوزیته و کدورت در نوشیدنی‌های انرژی‌زا فراسودمند مشاهده شد. همچنین ناپایداری کیتوزوم‌ها در طول دوره نگهداری، افزایش معنادار دوفاز شدن نوشیدنی‌ها را نشان داد. کاهش معنادار روشنایی، افزایش معنادار شاخص قرمزی و زردی نوشیدنی‌ها حاوی نانوکیتوزوم‌ها و نیز افزایش معنادار محتوی فنولی نوشیدنی‌های انرژی‌زا غنی شده مشاهده شد. بنابراین نانو کیتوزوم‌های حاوی تانن-اسید لینولئیک کنژوگه می‌تواند یک سیستم رهایش بالقوه برای مولکولی فعال زیستی به عنوان مکمل‌های غذایی و افزایش ایمنی مواد غذایی باشند.

#### ۴- نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش، نوشیدنی انرژی‌زا حاوی ریز ذرات کیتوزوم درهم تنیده شده با ترکیبات زیست فعال تانن-اسید لینولئیک کنژوگه پرداخته شد. پاداری اکسایشی اسید لینولئیک، گروه‌های عاملی با طیف‌سنجی FTIR، پراش اشعه ایکس کیتوزوم‌ها و ریخت‌شناسی آن‌ها بررسی شد و در نهایت ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی (pH، اسیدیته، کدورت، دوفاز شدن و ویسکوزیته) و شاخص رنگ ( $L^*$ ،  $a^*$  و  $b^*$ ) و محتوی فنل کل نوشیدنی‌ها در شرایط دمایی ۵ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد طی ۴۵ روز نگهداری پایش شد. ارزیابی کیفی ریز کپسول کیتوزوم بهینه وجود این اشتراکات در طیف‌های FTIR بیانگر پوشش‌دهی موفقیت‌آمیز زیست فعال تانن-اسید لینولئیک درون کیتوزان بود. بررسی مورفولوژی عصاره یخ زده‌ی ضایعات زیستی انار استخراج شده به کمک امواج اولتراسونیک تشکیل اندازه ذرات کوچک در حد نانومتر (بین محدوده ۴۸/۵۸ nm تا ۶۲/۲۱۴) به شکل شیشه مانند را نشان داد. همچنین وجود ذرات تقریباً کروی کیتوزان با اندازه نانومتری (۷۷/۶۶ nm و



- [1] Arjeh, E., Khodaei, S. M., Barzegar, M., Pirsai, S., Karimi Sani, I., Rahati, S., & Mohammadi, F. (2022). Phenolic compounds of sugar beet (*Beta vulgaris* L.): Separation method, chemical characterization, and biological properties. *Food Science & Nutrition*, 10(12), 4238-4246.
- [2] Badawy, S., Liu, Y., Guo, M., Liu, Z., Xie, C., Marawan, M. A., ... & Martínez, M. A. (2023). Conjugated linoleic acid (CLA) as a functional food: Is it beneficial or not?. *Food Research International*, 113158.
- [3] Nasrollahzadeh, A., Tavani, S. M., Arjeh, E., & Jafari, S. M. (2023). Production of conjugated linoleic acid by lactic acid bacteria; important factors and optimum conditions. *Food Chemistry: X*, 100942.
- [4] Costantino, A., Maiese, A., Lazzari, J., Casula, C., Turillazzi, E., Frati, P., & Fineschi, V. (2023). The dark side of energy drinks: a comprehensive review of their impact on the human body. *Nutrients*, 15(18), 3922.
- [5] Ain, H. B. U., Tufail, T., Bashir, S., Ijaz, N., Hussain, M., Ikram, A., ... & Saewan, S. A. (2023). Nutritional importance and industrial uses of pomegranate peel: A critical review. *Food Science & Nutrition*, 11(6), 2589-2598.
- [6] Tehranifar. and weaponization, Y. (2006). Location of pomegranate in Iran. *The second desert ruby pomegranate festival*. [in Persian].
- [7] Ko, K., Dadmohammadi, Y., & Abbaspourrad, A. (2021). Nutritional and bioactive components of pomegranate waste used in food and cosmetic applications: A review. *Foods*, 10(3), 657.
- [8] Akuru, E. A., Chukwuma, C. I., Oyeagu, C. E., Mpendulo, T. C., & Lewu, F. B. (2023). Potential Relevance of Pomegranate (*Punica granatum*) Peel in the Nutrition, Health, and Quality Products of Poultry. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 13(4), 627-646.
- [9] Gomes, P. W. P., Gomes, E. R. S., Carvalho, A. R., Mannocho-Russo, H., Leão, T. F., Reis, J. D. E., ... & da Silva, M. N. (2023). Characterization of a tetrameric proanthocyanidin in *Stryphnodendron pulcherrimum* and an overview on potential health benefits of condensed tannins via interaction with gut microbiota. *Journal of Functional Foods*, 109, 105801.
- [10] Tavakolipour, H., & Mokhtarian, M. (2023). Production of functional beverage based on cross-linked bioactive compounds of green tea and green coffee in chitosome structure. *Journal of food science and technology (Iran)*, 19(133), 79-89.
- [11] Shaddel, R., & Rajabi-Moghaddam, S. (2024). Encapsulation of caffeine in chitosan-coated nanoliposomes and its application in drink formulation. *Food Hydrocolloids*, 149, 109598.
- [12] Ramli, N. A., Ali, N., & Hamzah, S. (2019). Indo-Malayan Stingless Bees' Propolis Extract-Loaded Chitosomes: Characterization and Storage Stability Evaluation. *International Journal of Recent Technology and Engineering*, 7(6), 560-567.
- [13] da Silva, N. C., Assis, O. B. G., de Oliveira Sartori, A. G., de Alencar, S. M., & Martelli-Tosi, M. (2022). Chitosan suspension as extractor and encapsulating agent of phenolics from acerola by-product. *Food Research International*, 161, 111855.
- [14] Amiri, S., Mokarram, R. R., Khiabani, M. S., Bari, M. R., & Khaledabad, M. A. (2020). In situ production of conjugated linoleic acid by *Bifidobacterium lactis* BB12 and *Lactobacillus acidophilus* LA5 in milk model medium. *LWT*, 132, 109933.
- [15] Kodchasee, P., Pharin, N., Suwannarach, N., Unban, K., Saenjum, C., Kanpiengjai, A., ... & Khanongnuch, C. (2023). Assessment of Tannin Tolerant Non-Saccharomyces Yeasts Isolated from Miang for Production of Health-Targeted Beverage Using Miang Processing Byproducts. *Journal of Fungi*, 9(2), 165.
- [16] AOAC. (1998). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (17th ed.). Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC, USA.
- [17] Tavakolipour, H., Mokhtarian, M., & Kalbasi-Ashtari, A. (2017). Lipid oxidation kinetics of pistachio powder during different storage conditions. *Journal of food process engineering*, 40(3), e12423.
- [18] Rajha, H. N., Koubaa, M., Boussetta, N., Maroun, R. G., Louka, N., Lebovka, N., & Vorobiev, E. (2020). Selective ultrasound-assisted aqueous extraction of polyphenols from pomegranate peels and seeds. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(7), e14545.
- [19] Mokhtarian, M. O. H. S. E. N., Tavakolipour, H., Jafari Savareh, S., & Amiri, M. (2014). Determination of optimal parameters to extraction and formulation of functional drink from green tea and determining its physicochemical and rheological properties. *Research and Innovation in Food Science and Technology*, 3(1), 51-66. [in Persian].
- [20] Seyedabadi, M. M., Rostami, H., Jafari, S. M., & Fathi, M. (2021). Development and characterization of chitosan-coated nanoliposomes for encapsulation of caffeine. *Food bioscience*, 40, 100857.
- [21] Meng, R., Wu, Z., Xie, Q. T., Cheng, J. S., & Zhang, B. (2021). Preparation and characterization of zein/carboxymethyl dextrin nanoparticles to encapsulate curcumin: Physicochemical stability, antioxidant activity and controlled release properties. *Food Chemistry*, 340, 127893.
- [22] Yang, L., Cao, Y., Chen, J. N., & Chen, Z. Y. (2009). Oxidative stability of conjugated linolenic

acids. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(10), 4212-4217.

[23] ISIRI. (2007). Fruit juices – Test methods. Institute of Standards and Industrial Research of Iran No2685. [In Persian]

[24] HOJJATI, M., Jafari, S., & Noshad, M. (2018). Effect of Xanthan Gum and Soluble Soybean Polysaccharide on Characteristics of Functional Flixweed (*Descurainia Sophi L.*) Syrup. *Food Processing and Preservation Journal*, 10(2), 63-80. [in Persian].

[25] Kashksara, K. M., Tavakolipour, H., & Mokhtarian, M. (2023). Effects of atmospheric-thermosonication process on phenolic compounds extraction, extraction productivity and antioxidant activity of freeze-dried green tea and green coffee aqueous extracts. *Journal of Agriculture and Food Research*, 12, 100582.

[26] Yang, L., Leung, L. K., Huang, Y., & Chen, Z. Y. (2000). Oxidative stability of conjugated linoleic acid isomers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3072-3076.

[27] Drinić, Z., Mudrić, J., Zdunić, G., Bigović, D., Menković, N., & Šavikin, K. (2020). Effect of pomegranate peel extract on the oxidative stability of pomegranate seed oil. *Food Chemistry*, 333, 127501.

[28] Burits, M., & Bucar, F. (2000). Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy research*, 14(5), 323-328.

[29] Keshvari Fard, F., Mokhtarian, M., & Tavakolipour, H. (2020). Evaluation of the effects of peppermint essential oil (*Mentha piperita*) on oxidative stability of soybean oil. *Journal of Food Processing and Preservation*, 12(1), 81-94. [in Persian].

[30] Zhang, A., & Chen, Z. Y. (1997). Oxidative stability of conjugated linoleic acids relative to other polyunsaturated fatty acids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74, 1611-1613.

[31] Carvalho Filho, J. M. (2014). Pomegranate seed oil (*Punica granatum L.*): a source of punicic acid (conjugated  $\alpha$ -linolenic acid). *J Human Nutri Food Sci*, 2(1), 1-11.

[32] Zhang, A., & Chen, Z. Y. (1997). Oxidative stability of conjugated linoleic acids relative to other polyunsaturated fatty acids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74, 1611-1613.

[33] Shayanmehr, M. R., Elhamirad, A. H., & Armin, M. (2021). Optimization of conjugated linoleic acid (CLA) synthesis conditions applying it in milk enrichment. *J Res Innov Food Sci Technol*, 9, 375-88.

[34] Shahmoradi, A. R., Bejandi, M. S., Rasanani, E. H., Javidparvar, A. A., & Ramezanzadeh, B. (2023). Graphene oxide nano-layers functionalized/reduced by L-Citrulline/Pectin bio-molecules for epoxy nanocomposite coating mechanical properties reinforcement. *Progress in Organic Coatings*, 178, 107493.

[35] Nandiyanto, A. B. D., Oktiani, R., & Ragadhita, R. (2019). How to read and interpret FTIR spectroscopy of organic material. *Indonesian Journal of Science and Technology*, 4(1), 97-118.

[36] Jung, M. R., Horgen, F. D., Orski, S. V., Rodriguez, V., Beers, K. L., Balazs, G. H., ... & Lynch, J. M. (2018). Validation of ATR FT-IR to identify polymers of plastic marine debris, including those ingested by marine organisms. *Marine pollution bulletin*, 127, 704-716.

[37] Gholizadeh, E., Belibel, R., Bachelart, T., Bounadji, C., & Barbaud, C. (2020). Chemical grafting of cholesterol on monomer and PDMMLA polymers, a step towards the development of new polymers for biomedical applications. *RSC advances*, 10(54), 32602-32608.

[38] Febriyenti, M. N., Mohamed, N., Hamdan, M. R., Salleh, S. N. M., & Baie, S. B. B. (2014). Comparison of freeze drying and spray drying methods of haruan extract. *Int J Drug Deliv*, 6(3), 286-91.

[39] Scurti, E., Martins, J. P., Celia, C., Palumbo, P., Lombardi, F., Iannotta, D., ... & Viitala, T. (2023). In Vitro Characterization and Real-Time Label-Free Assessment of the Interaction of Chitosan-Coated Niosomes with Intestinal Cellular Monolayers. *Langmuir*, 39(23), 8255-8266.

[40] Nerli, G., Robla, S., Bartalesi, M., Luceri, C., D'Ambrosio, M., Csaba, N., & Maestrelli, F. (2023). Chitosan coated niosomes for nose-to-brain delivery of clonazepam: formulation, stability and permeability studies. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 6, 100332.

[41] Hashemi, F. S., Farzadnia, F., Aghajani, A., Ahmadzadeh NobariAzar, F., & Pezeshki, A. (2020). Conjugated linoleic acid loaded nanostructured lipid carrier as a potential antioxidant nanocarrier for food applications. *Food Science & Nutrition*, 8(8), 4185-4195.

[42] Fikry, M., Yusof, Y. A., Al-Awaadh, A. M., Baroyi, S. A. H. M., Ghazali, N. S. M., Kadota, K., ... & Al-Ghamdi, S. (2023). Assessment of Physical and Sensory Attributes of Date-Based Energy Drink Treated with Ultrasonication: Modelling Changes during Storage and Predicting Shelf Life. *Processes*, 11(5), 1399.

[43] Davídek, T., Robert, F., Devaud, S., Vera, F. A., & Blank, I. (2006). Sugar fragmentation in the Maillard reaction cascade: Formation of short-chain carboxylic acids by a new oxidative  $\alpha$ -dicarbonyl cleavage pathway. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(18), 6677-6684.

[44] Akubor, P. I. (1996). The suitability of African bush mango juice for wine production. *Plant Foods for Human Nutrition*, 49, 213-219.

[45] Selahvarzi, A., Ramezan, Y., Sanjabi, M. R., Mirsaedghazi, H., Azarikia, F., & Abedinia, A. (2021). Investigation of antimicrobial activity of orange and pomegranate peels extracts and their use as a natural preservative in a functional

beverage. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15, 5683-5694.

[46] Saberi, A. H., Fang, Y., & McClements, D. J. (2013). Fabrication of vitamin E-enriched nanoemulsions: Factors affecting particle size using spontaneous emulsification. *Journal of colloid and interface science*, 391, 95-102.

[47] Bindes, M. M. M., Reis, M. H. M., Cardoso, V. L., & Boffito, D. C. (2019). Ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from green tea leaves and clarification with natural coagulants (chitosan and *Moringa oleifera* seeds). *Ultrasonics sonochemistry*, 51, 111-119.

[48] Cardozo, C. J. M., Castañeda, C. A. J., & Ripoll, C. S. S. (2017). Development of mango (*Mangifera indica* L.) energy drinks. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 70(1), 8115-8121.

[49] Zendeboodi, F., & Ghollan, H. M. (2019). Optimization of formulation of energetic soft drink containing natural sweetener and whey protein using mixture design-extreme vertices. *Journal of food science and technology (Iran)*, 16(89), 113-123. [in Persian].

[50] Elkot, W. F., Elmahdy, A., Talaat, H., Alghamdia, O. A., Alhag, S. K., Al-Shahari, E. A., ... & Ismail, H. A. (2024). Development and characterization of a novel flavored functional fermented whey-based sports beverage fortified with *Spirulina platensis*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 258, 128999.

[51] Iida, A. S. L., Luz, K. N., Barros-Alexandrino, T. T., Fávares-Trindade, C. S., Pinho, S. C. D., Assis, O. B. G., & Martelli-Tosi, M. (2020). Investigation of TPP-Chitosomes particles structure and stability as encapsulating agent of cholecalciferol. *Polímeros*, 29.

[52] Katouzian, I., & Taheri, R. A. (2021). Preparation, characterization and release behavior of

chitosan-coated nanoliposomes (chitosomes) containing olive leaf extract optimized by response surface methodology. *Journal of Food Science and Technology*, 58, 3430-3443.

[53] Peng, S., Zou, L., Liu, W., Liu, C., & McClements, D. J. (2018). Fabrication and characterization of curcumin-loaded liposomes formed from sunflower lecithin: Impact of composition and environmental stress. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(46), 12421-12430.

[54] Sami, R., Khojah, E., Alharbi, M., Al-Mushhin, A., Saeed Alkaltham, M., Mohammad Salamatullah, A., ... & Helal, M. (2021). Functional effects of pomegranate peel extracts on milk: Antibacterial measurements, antioxidant activities, and photochemical characterizations. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, 15(5), 571-579.

[55] Shabani, M., Mokhtarian, M., Kalbasi-Ashtari, A., & Kazemipoor, R. (2021). Effects of extracted propolis (*Apis mellifera*) on physicochemical and microbial properties of rainbow-trout fish burger patties. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(12), e16027.

[58] Tai, K., Rappolt, M., Mao, L., Gao, Y., Li, X., & Yuan, F. (2020). The stabilization and release performances of curcumin-loaded liposomes coated by high and low molecular weight chitosan. *Food Hydrocolloids*, 99, 105355.

[59] Liu, F., Avena-Bustillos, R. J., Chiou, B. S., Li, Y., Ma, Y., Williams, T. G., ... & Zhong, F. (2017). Controlled-release of tea polyphenol from gelatin films incorporated with different ratios of free/nanoencapsulated tea polyphenols into fatty food simulants. *Food Hydrocolloids*, 62, 212-221.



## Scientific Research

## Feasibility of producing a functional energy drink containing tannin-linoleic acid conjugated chitosome

Morteza Jamshid Eini<sup>1</sup>, Hamid Tavakolipour<sup>\*2</sup>, Rezvan Mosavi Nadoshan<sup>3</sup>, Mohsen Mokhtarian<sup>4</sup>

1-Department of Food Science and Technology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2 -Department of Food Science and Technology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

3 -Department of Food Science and Technology, Faculty of Biological Science, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

4 -Department of Food Science and Technology, Roudehen Branch, Islamic Azad University, Roudehen, Iran.

## ARTICLE INFO

## ABSTRACT

**Article History:**

Received:2024/5/25

Accepted:2024/9/30

**Keywords:**

conjugated linoleic acid,  
tannin,  
chitosome,  
pomegranate peel extract,  
sports drink

**DOI: 10.22034/FSCT.22.158.99.**

\*Corresponding Author E-  
tavakolipour@gmail.com

Nowadays, due to the interest in consuming extra-beneficial foods and the increasing spread of cardiovascular diseases, the desire to consume extra-beneficial products has increased. Therefore, researchers are looking for the optimization of new formulations of products with practical features in this direction. The study aimed to produce a functional energy drink containing tannin-linoleic acid-conjugated chitosome. After extracting bioactive compounds (especially tannin) from pomegranate peel, they were included in the structure of chitosomes along with conjugated linoleic acid. The results showed the significant effect of different concentrations of pomegranate biological extract on the oxidative stability of linoleic acid. The results showed the significant effect of different concentrations of pomegranate biological extract on the oxidative stability of linoleic acid. The examination of nano-chitosome groups showed the presence of structures in pomegranate bioactive along with linoleic acid in chitosomes. The uniformly chitosan spherical particles were observed with sizes of 77.66 and 79.90 nm. The addition of nano chitosomes showed a significant increase in pH (decrease in acidity), increase in turbidity, viscosity, two phases, and phenolic content. Also, a decrease in the  $L^*$  value and an increase in  $a^*$  and  $b^*$  values were reported. The present results showed that biopolymers play a key role in the stability of the liposome membrane structure. They have a stable release of molecules trapped by a spatial barrier on the surface. This nano chitosome will provide a potential platform for the carrier's design for nutrients or preservatives, to increase the shelf life and safety of food matrices.