

مقایسه روش کم انرژی و پر انرژی در طراحی و ساخت نانوامولسیون روغن هسته انار پایدار شده با مخلوط سورفکتانت های غیریونی

سعید صادقی^۱، میر خلیل پیروزی فرد^{۲*}، زهرا امام جمعه^۳

۱- دکتری تخصصی گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

۲- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

۳- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

(تاریخ دریافت: ۹۷/۰۳/۰۴ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۲/۱۹)

چکیده

روغن هسته انار روغن خوراکی استخراج شده از ضایعات فراوری میوه انار است که به دلیل دارا بودن مقادیر زیاد پونیسیک اسید و ترکیبات پلی فنولی طیف وسیعی از فعالیت های بیولوژیکی و سلامت بخش را نشان می دهد. به دلیل حلالیت کم و حساسیت زیاد به اکسیداسیون، به منظور استفاده از این روغن در صنایع غذایی و نوشیدنی، سامانه های انتقال برپایه نانوامولسیون پیشنهاد مناسبی می باشند. نانوامولسیون ها می توانند با استفاده از روش های پر انرژی یا کم انرژی ساخته شوند که هر کدام دارای مزایا و محدودیت هایی می باشند. در این پژوهش تشکیل نانوامولسیون های روغن هسته انار حاوی سورفکتانت های غیر یونی (اسپن ۸۰ و توئین ۸۰) با استفاده از روش پراثری (فراصوت) و روش کم انرژی (امولسیون سازی خود به خودی) مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. نتایج نشان داد هر دو روش قادر به تشکیل اندازه قطرات ریز (کمتر از ۱۵۰ نانومتر) در نسبت سورفکتانت به روغن ۱/۵ هستند با این تفاوت که اندازه قطرات برای روش پراثری (93 ± 5 نانومتر) به طور معنی داری کمتر از روش کم انرژی (166 ± 8 نانومتر) بود. اثر دمای نگهداری (۴، ۲۵ و ۵۵ درجه سلسیوس) بر پایداری فیزیکی نانوامولسیون های منتخب نشان داد نانوامولسیون های تهیه شده با هر دو روش در دمای پایین (۴ درجه سلسیوس) به خوبی پایدار بودند اما در دمای بالا (۵۵ درجه سلسیوس) به دلیل افزایش اندازه قطرات دچار ناپایداری شدند. همچنین مطالعات اکسایشی نانوامولسیون های منتخب در طول ۳۰ روز نگهداری نشان داد روغن امولسیون شده به روش کم انرژی نسبت به روغن امولسیون شده به روش پراثری پایداری اکسایش بیشتری داشت.

کلید واژگان: نانوامولسیون، روغن هسته انار، امولسیون سازی خود به خودی، فراصوت، پایداری امولسیون.

* مسئول مکاتبات: k.pirouzifard@yahoo.com

۱- مقدمه

میوه انار (*Punica granatum L.*) از قدیمی‌ترین میوه‌های شناخته شده است که به طور وسیعی در مناطق خاورمیانه به ویژه ایران رشد می‌کند. بخش خوراکی میوه انار به صورت تازه مصرف شده و یا به صورت آبمیوه و کنسانتره در کارخانجات مواد غذایی، فراوری می‌شود. حدود ۲۲ درصد از میوه انار را هسته تشکیل داده که منبع غنی پروتئین و روغن است و می‌تواند پس از فراوری، به عنوان افزودنی در صنعت غذا استفاده شود [۱]. روغن هسته انار بسته به رقم انار، رسیدگی، اثرات محیطی و زمان برداشت حدود ۶/۶ تا ۲۴ درصد وزن کلی هسته را تشکیل می‌دهد. اسیدهای چرب عمده این روغن به ترتیب مقدار شامل پونسیک اسید (۳۱ تا ۸۶ درصد)، لینولئیک اسید (۰/۷ تا ۲۴/۴ درصد) و اولئیک اسید (۰/۴ تا ۱۷/۴ درصد) هستند و بنابراین نسبت اسیدهای چرب غیراشباع به اشباع آن به شدت بالاست که می‌تواند برای مصرف کنندگانی که تمایل دارند ترکیبات اسید چرب غیر اشباع بیشتری را از چربی‌های رژیم غذایی خود دریافت کنند، مورد توجه قرار گیرد [۲]. بعلاوه روغن هسته انار حاوی مقادیر زیادی ترکیبات پلی فنولی است و به همین دلیل فعالیت‌های بیولوژیکی قابل توجهی به ویژه در زمینه خواص آنتی اکسیدانی و تقویت سیستم ایمنی بدن دارد [۳]. بنابراین با توجه به خصوصیات غذا-دارویی روغن هسته انار در جهت افزایش سلامت انسان و همچنین به دلیل تولید سالانه بسیار زیاد هسته انار به عنوان یک محصول فرعی از صنعت فراوری میوه، ایجاد شرایطی برای کاربرد بیشتر این ماده در رژیم غذایی می‌تواند مورد توجه قرار گیرد [۴]. با اینحال افزودن روغن ها به مواد غذایی به دلیل حلالیت کم و حساسیت زیاد به اکسیداسیون، به ویژه زمانی که در معرض اکسیژن، نور، رطوبت و دما قرار می‌گیرند، در بیشتر موارد دشوار است [۵]. امروزه روش‌های مختلفی جهت انتقال و بهبود جذب ترکیبات چربی دوست در مواد غذایی در قالب استفاده از روش‌های درون پوشانی^۱ توسعه یافته است که از این میان سامانه‌های انتقال کلئیدی بر پایه امولسیون‌ها به طور گسترده‌ای در سیستم‌های تجاری مورد استفاده قرار می‌گیرند [۶، ۷]. در همین راستا نانو امولسیون‌ها، به عنوان سامانه‌های

کلئیدی نیمه پایدار با اندازه قطرات بین ۲۰ تا ۲۰۰ نانومتر، پتانسیل بالایی نسبت به امولسیون‌های مرسوم برای کاربردهای ویژه در مواد غذایی و نوشیدنی دارند [۶].

مرسوم ترین روش آماده‌سازی نانوامولسیون‌ها در صنایع غذایی، روش‌های پرانرژی شامل میکروفلوئیداسیون^۳، هموژنایزر فشار بالا^۴ و فراصوت^۵ هستند که قادر به تولید در مقیاس بالا و استفاده از طیف وسیعی از روغن‌ها و امولسیفایرها می‌باشند. در تمامی این روش‌ها نیروهای شکننده قوی ایجاد می‌شود که به طور مکانیکی فاز روغنی را به قطرات بسیار کوچکی شکسته و در فاز آبی پراکنده می‌کند. اما اغلب این روش‌ها به دلیل نیاز به تجهیزات اولیه پرهزینه و انرژی زیاد با محدودیت‌هایی همراه است [۸]. نانوامولسیون‌ها همچنین می‌توانند به وسیله روش‌های کم انرژی مانند امولسیون سازی خود به خودی^۶ و روش تغییر فاز تشکیل شوند. این روش‌ها بر مبنای تشکیل خود به خودی قطرات بسیار ریز روغن در سامانه سورفکتانت-روغن-آب تحت شرایط محیطی ویژه (ترکیب، دما، هم زدن) پایه‌گذاری شده‌اند که به تجهیزات و انرژی کمتری نیاز دارند و به سادگی قابل اجرا هستند اما به دلیل محدودیت در نوع سورفکتانت و روغن مورد استفاده و همچنین مصرف مقادیر زیاد سورفکتانت با مشکلاتی مواجه هستند [۹]. هدف از این مطالعه مقایسه کارایی روش پرانرژی (فراصوت) و روش کم انرژی (امولسیون سازی خود به خودی) در تشکیل نانوامولسیون‌های روغن هسته انار با استفاده از مخلوط سورفکتانت‌های غیریونی (توئین ۸۰، اسپن ۸۰) و بررسی پایداری آنها در طی نگهداری می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

روغن هسته انار استخراج شده به روش پرس سرد از یک کارگاه روغن‌کشی در تهران خریداری شد. توئین ۸۰ (پلی اکسی اتیلن سوربیتان منو اولئات) و اسپن ۸۰ (سوربیتان منو اولئات) از شرکت مرک آلمان خریداری گردید. تیوباربتوریک اسید، تری

2. Meta Stable
3. Microfluidation
4. High Pressure Homogenizer
5. Sonication
6. Spontaneous Emulsification

1. Encapsulation

کلرواستیک اسید از شرکت سیگما تهیه شد. از آب دوبار تقطیر در تشکیل نانوامولسیون‌ها و محلول‌ها استفاده شد.

۲-۲-۲- روش‌ها

۲-۲-۱- خصوصیات فیزیکوشیمیایی روغن

ضریب شکست و ویسکوزیته روغن به ترتیب به وسیله دستگاه رفاکتومتر رومیزی (مدل G، شرکت Carl-Zeiss، آلمان) و دستگاه ویسکومتر دیجیتال بروکفیلد (مدل DV-II+Pro، آمریکا) در دمای محیط اندازه‌گیری شد. همچنین دانسیته روغن به وسیله هیدرومتر (Proton، مدل ۷۲۰۸۲، اسپانیا) در دمای ۲۰ درجه سلسیوس تعیین شد.

۲-۲-۲- آماده سازی نانوامولسیون

۲-۲-۲-۱- روش فراصوت

ابتدا فاز آلی حاوی روغن و سورفکتانت با هم مخلوط و به فاز آبی افزوده شد. سپس به وسیله هموژنایزر اولتراتوراکس (مدل GE710 Compact، شرکت Metabo، آلمان) با سرعت ۳۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه مخلوط شد تا امولسیون اولیه^۱ تشکیل شود. ترکیب کلی نمونه‌ها شامل ۵ درصد روغن، ۲/۵ تا ۱۰ درصد سورفکتانت (مخلوط توئین ۸۰ و اسپن ۸۰ با تعادل آبدوست-چربی دوست^۲ ۱۱) و ۹۲/۵ تا ۸۵ درصد آب بود. امولسیون اولیه سپس تحت امواج فراصوت (مدل UP200S، شرکت hielscher، آلمان) با قدرت ثابت ۲۰۰ وات، دوره^۳ ثابت ۰/۵ و بزرگی نوسان (۱۰۰ درصد) به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفت تا نانوامولسیون نهایی تشکیل شود. پروب دستگاه در ۰/۵ سانتی متر از سطح امولسیون قرار داده شد. اختلاف دما بین امولسیون اولیه و نانوامولسیون نهایی به وسیله قرار دادن نمونه‌ها در بشر بزرگتر حاوی یخ در کمتر از ۱۰ درجه سلسیوس نگه داشته شد. نمونه‌های ساخته شده پس از یک روز نگهداری در دمای محیط مورد آزمون قرار گرفتند [۱۰].

۲-۲-۲-۲- امولسیون سازی خود به خودی

فاز آلی شامل ۵ درصد روغن هسته انار و ۲/۵ تا ۱۰ درصد سورفکتانت (مخلوط توئین ۸۰ و اسپن ۸۰ با تعادل آبدوست-چربی دوست ۱۱) به وسیله همزن مغناطیسی (مدل CB162،

شرکت STUART، انگلستان) با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه، همگن شده و سپس در دمای آزمایشگاه با سرعت ۱ میلی لیتر در دقیقه به فاز آبی (۹۲/۵ تا ۸۵ درصد آب مقطر)، در حالی که سامانه مرتباً با سرعت ثابت (۷۰۰ دور بر دقیقه) در حال هم زدن بود، اضافه شد. نمونه‌های ساخته شده پس از یک روز نگهداری در دمای محیط مورد آزمون قرار گرفتند [۹].

۲-۲-۳- پراکنش اندازه قطرات

متوسط اندازه قطرات، توزیع اندازه قطرات و شاخص چند اندازه-گی (PDI^۴) با استفاده از دستگاه تفرق پراش نوری^۵ (مدل Malvern Nano-ZS ZEN 3600، انگلستان) اندازه‌گیری شد. برای جلوگیری از اثر پخش نور، نمونه‌ها قبل از اندازه‌گیری ۲۰۰ برابر با آب رقیق شدند [۱۰].

۲-۲-۴- نگهداری طولانی مدت

نمونه‌های نانوامولسیون منتخب در لوله‌های شیشه‌ای ریخته شده و سپس در دماهای ۴، ۲۵ و ۵۵ درجه سلسیوس در طول مدت یک ماه نگهداری و تغییرات اندازه قطرات آنها مورد بررسی قرار گرفت.

۲-۲-۵- آزمون تیوباریتوریک اسید

محتوای ماده واکنشگر تیوباریتوریک اسید نمونه‌ها برای تعیین محصولات ثانویه واکنش اکسایش چربی‌ها در طی ۳۰ روز نگهداری در دمای ۴۰ درجه (به منظور تسریع فرایند اکسایش)، بررسی شد. ۱۵ گرم تری کلرواستیک اسید، ۰/۳۴ گرم تیوباریتوریک اسید و ۱/۷۶ میلی‌لیتر هیدروکلریدریک اسید ۱۲ مولار در ۸۲/۸ گرم آب به صورت محلول درآمد. سپس دو میلی‌لیتر از محلول حاصل با دو میلی‌لیتر نانوامولسیون مخلوط و برای ۱۵ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شد. پس از سرد کردن تا دمای محیط و سانتریفوژ مخلوط در ۴۰۰۰ g به مدت ۲۰ دقیقه، جذب روشناور^۶ در ۵۳۲ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر (مدل CE2502، شرکت Cecil Instruments Limited، کمبریج، انگلستان) اندازه‌گیری شد. غلظت تیوباریتوریک اسید در برابر منحنی استاندارد تهیه شده از

4. Polydispersity Index
5. Dynamic Light Scattering
6. Supernatant

1. Coarse emulsion
2. Hydrophilic-lipophilic balance
3. Cycle

مالون دی آلدئید محاسبه و نتایج به صورت غلظت میکرومول مالون دی آلدئید بر کیلوگرم روغن گزارش گردید [۱۰].

۲-۶- تجزیه و تحلیل آماری

آزمایشات به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. برای تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SAS (نسخه ۹/۴) و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد. تمامی تیمارها در دو یا سه تکرار انجام و نتایج بصورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش گردید.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- خصوصیات روغن هسته انار

ابتدا پروفایل اسیدهای چرب روغن هسته انار با استفاده از دستگاه

Table 1 Some physicochemical characteristics of Pomegranate Seed Oil (PSO).

	Viscosity (mPa.s)	Density (g.cm ⁻³)	Refractive Index
Cold-pressed PSO	24.2 $\pm$ 0.0	0.937 $\pm$ 0.001	1.498 $\pm$ 0.035

$SOR = 1/5$ کاهش یافته و سپس به 234 ± 6 نانومتر در $SOR = 2$ افزایش یافت. به طور کلی در نسبت سورفکتانت به روغن کم، به دلیل ناکافی بودن مقدار سورفکتانت، قطرات تازه تشکیل شده به سرعت به هم پیوسته و مانع از تشکیل امولسیون بامیانگین اندازه قطرات کوچک می‌شود. با افزایش غلظت سورفکتانت در $SOR = 1$ ، اندازه قطرات به میزان زیادی کاهش یافت زیرا سورفکتانت بیشتر قادر به انتشار سریع و قرارگیری در سطح قطرات تازه تشکیل شده می‌باشد که نتیجه آن کاهش اندازه قطرات است [۱۱]. در ادامه با افزایش میزان سورفکتانت در $SOR = 1/5$ ، سرعت کاهش اندازه قطرات کاهش یافت زیرا در این حالت سطح قطرات روغن تقریباً از سورفکتانت اشباع شده و بنابراین میزان سورفکتانت بیشتر نمی‌تواند کاهش زیادی در اندازه قطرات ایجاد کند [۸]. کاهش اندازه قطرات با افزایش نسبت سورفکتانت به روغن در تشکیل نانوامولسیون‌ها به روش خود به خودی و فراصوت توسط محققین مختلفی گزارش شده است [۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵]. این کاهش ممکن است به رفتار مخلوط فازهای سورفکتانت-روغن-آب مورد استفاده در تهیه نانوامولسیون نسبت داده شود. برای تشکیل نانوامولسیون با قطرات بسیار ریز همواره نیاز به میزان بهینه‌ای از سورفکتانت

به منظور تشکیل نانوامولسیون‌هایی با پایداری بالا، نسبت جرمی سورفکتانت‌های موجود جهت رسیدن به تعادل آب دوست-چربی دوست مناسب در سامانه مورد بررسی قرار گرفت و مطابق با نتایج بدست آمده در تمامی آزمایشات از تعادل آبدوست-چربی دوست ۱۱ استفاده شد (نتایج نشان داده نشده است).

۳-۲- مقایسه نانوامولسیون‌های تشکیل شده با

استفاده از روش پر انرژی و کم انرژی

تغییرات میانگین اندازه قطرات امولسیون‌ها/نانوامولسیون‌های تهیه شده به روش خود به خودی و فراصوت در شکل ۱ آورده شده است. با افزایش نسبت سورفکتانت به روغن (SOR^1) در روش کم انرژی، متوسط اندازه قطرات ابتدا از 612 ± 17 نانومتر در $SOR = 0/5$ به 166 ± 8 نانومتر در $SOR = 1/5$ کاهش و سپس تا 416 ± 16 نانومتر در $SOR = 2$ افزایش یافت. در روش پر انرژی نیز روند مشابه روش کم انرژی در متوسط اندازه قطرات مشاهده گردید با این تفاوت که اندازه قطرات نانوامولسیون به طور معنی داری کمتر از روش کم انرژی بود. به طوری که اندازه قطرات ابتدا از 315 ± 6 نانومتر در $SOR = 0/5$ به 93 ± 5 نانومتر در

1. Surfactant Oil Ratio

سورفکتانت به روغن ۱ و در روش خود به خودی به نسبت سورفکتانت به روغن ۱/۵ نیاز است (شکل ۲).

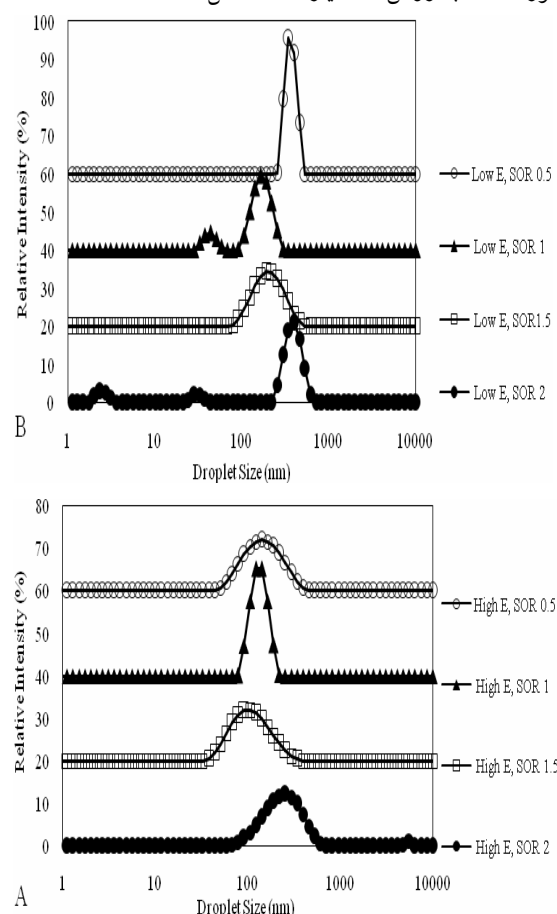


Fig 2 Droplet size distribution of emulsions/nanoemulsions formed by high energy(A) and low energy(B) method with different SORs. نتایج بدست آمده از مقایسه میانگین اندازه قطرات و شاخص چند اندازگی، نشان داد غلظت سورفکتانت در $SOR = 1/5$ می‌تواند نانوامولسیون با کوچکترین اندازه قطرات در هر دو روش ایجاد کند. به همین دلیل نانوامولسیون‌های با $SOR = 1/5$ جهت بررسی پایداری انتخاب و مورد آزمون قرار گرفتند.

۳-۳- پایداری طولانی مدت

پایداری طولانی مدت نانوامولسیون‌هایی از مهم‌ترین فاکتورهای تعیین کننده مدت زمان انبارمانی در محصولات تجاری است. به همین منظور در این بخش از پژوهش، پایداری نانوامولسیون‌های منتخب تشکیل شده با مخلوط سورفکتانت‌ها در دماهای مختلف

وجود دارد که باید برای هر ترکیب سورفکتانت-روغن-آب تعیین شود [۱۳]. در خصوص افزایش اندازه قطرات در غلظت بیشتر سورفکتانت ($SOR = 2$) دو دلیل محتمل است: مورد اول ایجاد کریستال‌های مایع در مرز بین فاز روغن-آب بوده که شکست قطرات و پراکندگی آنها را با مشکل مواجه می‌کند [۱۶]. مورد دوم به دام افتادن مولکول‌های آب در اثر اتصال عرضی با زنجیره‌های سورفکتانت‌ها بوده که نتیجه آن افزایش ویسکوزیته امولسیون و کاهش حرکت آزادانه مولکول‌های سورفکتانت می‌باشد [۱۷]. به نظر می‌رسد استفاده از روش پراش تا حدودی قادر به غلبه بر این مشکلات بوده است. افزایش اندازه قطرات با افزایش بیش از حد غلظت سورفکتانت نیز توسط برخی محقق گزارش شده است [۹، ۱۶، ۱۸].

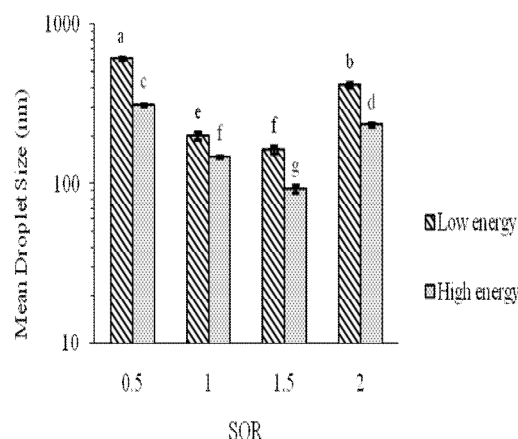


Fig 1 Effect of the SOR on the mean droplet size of emulsions/nanoemulsions produced by low energy and high energy method. Emulsions were prepared using 5 wt. % oil, 2.5-10 wt. % mixed surfactant, and 85-92.5 wt. % water. Columns with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

تأثیر غلظت سورفکتانت بر توزیع اندازه قطرات نانوامولسیون‌ها به روش خود به خودی و فراصوت در شکل ۲ آورده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود روش خودبه خودی نیز همانند روش فراصوت قادر به تشکیل نانوامولسیون‌هایی با اندازه قطرات کوچک است اما مقدار سورفکتانت مورد نیاز برای تشکیل قطرات کوچک با توزیع اندازه قطرات تک نمایی در این روش به طور معنی داری بیشتر از روش فراصوت است. برای مثال به منظور آماده سازی نانوامولسیون‌هایی با اندازه قطرات در محدوده ۱۵۰ نانومتر با توزیع تک نمایی مناسب در روش فراصوت به نسبت

(۴، ۲۵ و ۵۵ درجه سلسیوس) در pH طبیعی نانوامولسیون مورد بررسی قرار گرفت.

مطابق با بررسی‌های انجام شده، در هر دو روش خود به خودی و فراصوت هیچ تغییر معنی‌داری در متوسط اندازه قطرات نانوامولسیون‌های نگهداری شده در دمای ۴ درجه سلسیوس در طول مدت یک ماه مشاهده نشد که نشان دهنده پایداری بالای نانوامولسیون‌های تولید شده نسبت به سازوکارهای ناپایدار کننده در این دما می‌باشد (شکل ۳). این ثبات در اندازه قطرات نشان دهنده این است که در هر دو روش ذرات سورفکتانت با نیروهای قوی جذب سطح قطرات شده‌اند [۱۹]. در دمای ۲۵ درجه سلسیوس شاهد افزایش ۱۲ درصدی (۱۷۱ نانومتر در روز اول به ۱۹۲ نانومتر در روز سی) متوسط اندازه قطرات نانوامولسیون‌های تهیه شده به روش خود به خودی بودیم؛ در حالی که در این دما در نانوامولسیون‌های تشکیل شده به روش فراصوت تغییر معنی داری مشاهده نگردید (شکل ۳). در توجیه تفاوت ایجاد شده در پایداری نانوامولسیون‌های منتخب می‌توان گفت از آنجایی که در روش فراصوت اندازه قطرات نسبت به روش خوبخودی میانگین کمتری دارند، به نظر می‌رسد به علت کفایت حرکات بروانی قطرات برای غلبه بر نیروهایی که باعث جدایی گرانشی می‌شوند این نانوامولسیون‌ها پایدار مانده‌اند. به عبارت دیگر با کاهش اندازه قطرات نیروهای جاذبه بین دو قطره روغن سریع‌تر از نیروی دافعه بین آنها کاهش می‌یابد که این به معنای پایداری بیشتر قطرات کوچک‌تر برابر تجمع می‌باشد [۹]. بعلاوه مطالعات سوگومار و همکارانش (۲۰۱۶) نشان داده است که اعمال فراصوت در سامانه علاوه بر ریزتر کردن اندازه قطرات موجب پایداری بیشتر نانوامولسیون‌ها در طول زمان شده است که می‌تواند کارایی روش فراصوت در پایداری بهتر نمونه‌ها در شرایط یکسان نسبت به روش خودبخودی را نشان دهد [۱۹].

در دمای ۵۵ درجه سلسیوس به ترتیب شاهد افزایش ۳۱ درصدی (۱۷۱ نانومتر در روز اول به ۲۲۴ نانومتر در روز سی) و افزایش ۶۹ درصدی (۹۱ نانومتر در روز اول به ۱۵۴ نانومتر در روز سی)

در متوسط اندازه قطرات به روش خود به خودی و فراصوت بودیم که به صورت یک لایه بسیار نازک در سطح امولسیون قابل مشاهده بود (شکل ۳). صابری و همکاران (۲۰۱۳) در بررسی فاکتورهای موثر بر اندازه قطرات نانوامولسیون روغن زنجیر متوسط حاوی ویتامین E و سورفکتانت‌های غیریونی به روش خود به خودی دلایل ناپایداری در طی نگهداری طولانی مدت را به اندازه قطرات ریز و متعاقبا حساسیت به پدیده استوالد و همچنین مقدار نسبتا زیاد سورفکتانت و متعاقبا ایجاد میسل‌های آزاد در فاز پیوسته نسبت داده‌اند. با کاهش اندازه قطرات، حساسیت نانوامولسیون‌ها به پدیده استوالد به دلیل افزایش نیروی محرکه (فشار لاپلاس)، افزایش می‌یابد. به عبارتی به دلیل اختلاف فشار لاپلاس بین قطرات فاز پراکنده، قطرات کوچک با فشار لاپلاس زیاد به قطرات بزرگ می‌پیوندند. بنابراین یک دلیل احتمالی ناپایداری حساسیت قطرات ریز به پدیده استوالد می‌باشد. دلیل احتمالی دیگر مقدار زیاد سورفکتانت در سامانه امولسیونی است. در سطوح سورفکتانت نسبتا بالا، ممکن است مقدار قابل توجهی میسل‌های سورفکتانت آزاد در فاز پیوسته وجود داشته باشد که می‌تواند مولکول‌های روغن را از طریق سازوکار استوالد یا تهی شدن^۱ بین قطرات منتقل کند [۹]. باراداس و همکاران (۲۰۱۴) نیز در بررسی نانوامولسیون‌های حاوی روغن رازیانه و سورفکتانت‌های غیریونی یکی از دلایل ناپایداری در نگهداری طولانی مدت را به حضور احتمالی میسل-های آزاد در غلظت بالای سورفکتانت نسبت دادند که می‌تواند حلالیت روغن را در مرکز میسل افزایش داده و انتشار روغن را تسهیل کند [۲۰]. بعلاوه تجزیه شیمیایی یا هیدرولیز سورفکتانت در مدت انبارمانی در دمای بالا نیز ممکن است با کاهش اثر بخشی سورفکتانت، باعث ناپایداری شده باشد [۲۱]. با توجه به افزایش قابل توجه اندازه قطرات در روش فراصوت، احتمالا استفاده از انرژی بالا نیز در تجزیه و هیدرولیز بیشتر سورفکتانت موثر بوده است. نتایج حاصل پیشنهاد می‌کند که نانوامولسیون‌های

اکسایش یک فرایند وابسته به زمان بوده و برای تشکیل محصولات ثانویه نیاز به گذشت زمان است. در طی نگهداری، محصولات ثانویه در روغن امولسیون نشده به طور معنی‌داری افزایش یافت که این افزایش به حساسیت اسیدهای چرب به ویژه انواع چند غیراشباعی به اکسایش نسبت داده می‌شود [۲۲]. از طرفی در طی نگهداری نانوامولسیون‌ها نیز شاهد افزایش قابل توجهی در میزان محصولات ثانویه بودیم. با ذکر این نکته که شدت آن در روش کم انرژی کمتر از روش پرنرژی بود. یکی از دلایل افزایش محصولات ثانویه، به فرایند آماده‌سازی نانوامولسیون‌ها نسبت داده می‌شود. استفاده از روش‌های پرنرژی موجب افزایش تقریبی دما و در معرض قرار گرفتن اسیدهای چرب در دمای بالا شده که در تسریع برهم‌کنش‌های اکسایش موثر است [۶]. به عبارتی شدت امواج فراصوتی‌تواند گونه‌های رادیکالی (OH و H) تولید کند که ممکن است موجب فعال سازی واکنش زنجیره‌ای اکسایشی چربی‌ها شود [۱۰]. این نتایج در توافق با مطالعات طبیبی آذر و همکاران (۲۰۱۵) است که تاثیر فراصوت را بر پایداری اکسایشی نانوامولسیون روغن ذرت مورد بررسی قرار دادند. ایشان در پژوهش خود نشان دادند محتوای TBARS در نانوامولسیون‌های فراصوت‌شده به طور معنی‌داری بیشتر از نانوامولسیون‌های فراصوت‌نشده بود [۱۰]. همچنین با توجه به اینکه در روش فراصوت، اندازه قطرات کوچکتر است، انتظار می‌رود به دلیل ناحیه سطحی بیشتر قطرات روغن، واکنش اکسایش بیشتر اتفاق افتاده و متعاقباً محصولات واکنش اکسایش بیشتر باشد [۲۳].

همان‌طور که مشاهده می‌شود علیرغم افزایش محتوای محصولات ثانویه در روغن امولسیون نشده و نانوامولسیون‌ها، فرایند نانوامولسیون سازی توانسته به میزان قابل توجهی از شدت اکسایش بکاهد. در توضیح این پدیده می‌توان گفت اکسایش چربی‌ها در امولسیون‌ها به دلیل واکنش رادیکال‌های آزاد با چربی‌های غیراشباع در قطرات و به طور عمده در مرز بین فاز روغن-آب اتفاق می‌افتد. سورفکتانت‌ها در لایه بین سطحی می‌توانند یک مانع فیزیکی (استریک) بین پروکسیدان‌ها و فاز روغنی ایجاد کنند که این اثر به ضخامت آنها و متعاقباً به گروه‌های سر سورفکتانت بستگی دارد [۲۴]. سورفکتانت می‌تواند در اطراف قطرات روغن در امولسیون به صورت یک غشا و یا به صورت میسل‌های

پایدار شده با سورفکتانت‌های غیریونی ممکن است در برابر نگهداری طولانی مدت در دماهای بالا ناپایدار باشند.

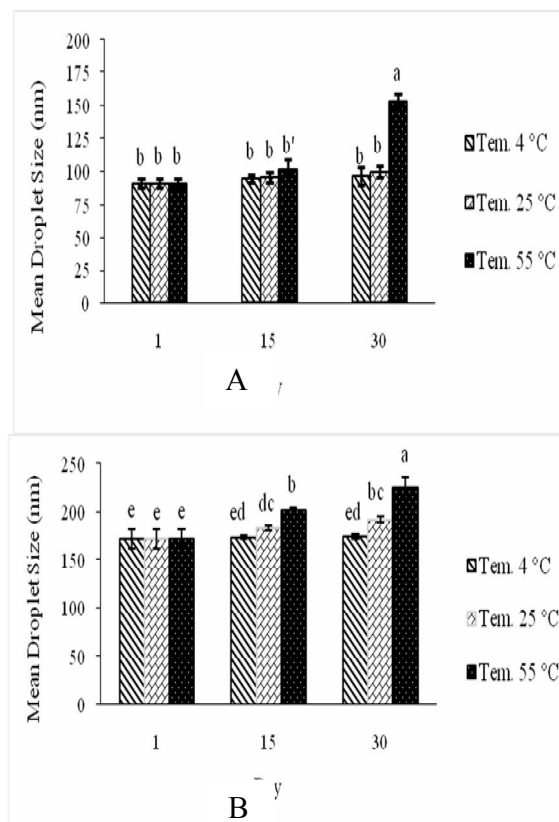


Fig 3 Effect of storage temperature (4, 25 and 55 °C) on the mean droplet size of nanoemulsions in SOR=1.5 produced by sonication (A) and spontaneous emulsification (B) within a period of 30 days.

۳-۴- پایداری اکسایشی

نظارت بر پایداری اکسایشی نانوامولسیون‌ها در کاربردهای غذایی و دارویی به ویژه زمانی که اسیدهای چرب چند غیر اشباعی حساس به اکسایش در آنها استفاده می‌شود بسیار مهم است. شکل ۴ اثر روش‌های پرنرژی و کم انرژی در پایداری اکسایشی نانوامولسیون روغن هسته انار به وسیله اندازه‌گیری محتوای TBARS نانوامولسیون‌ها در طی ۳۰ روز نگهداری در دمای ۴۰ درجه سلسیوس را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود بلافاصله پس از تشکیل نانوامولسیون‌ها میزان محصولات ثانویه افزایش معنی‌داری ندارد. به نظر می‌رسد که علت عدم افزایش TBARS به ویژه پس از فراصوت به این دلیل است که

به روش کم انرژی نشان داد اما در دمای بالا به شدت ناپایدار شد. از طرفی پایداری اکسایشی نانوامولسیون به روش کم انرژی به طور معنی داری بیشتر از روش پرانرژی بود. نیاز به سورفکتانت بیشتر در روش کم انرژی و هزینه تجهیزات بالا در روش پرانرژی کاربرد این روش‌ها در صنعت غذا را با محدودیت‌هایی مواجه کرده است. اما بنابر دلایل اقتصادی، اثرگذاری بر عطر و طعم و نیز امنیت غذایی، هر چه از سورفکتانت کمتری برای تشکیل قطرات کوچک استفاده شود، مطلوب‌تر است. به نظر می‌رسد مطالعات بیشتر برای استفاده از روش کم انرژی به منظور تولید نانوامولسیون‌هایی با اندازه قطرات ریز بدون نیاز به سورفکتانت بالا مورد نیاز است.

۵- منابع

- [1] Fadavi, A., Barzegar, M., Azizi, M.H. 2006. Determination of fatty acids and total lipid content in oilseed of 25 pomegranates varieties grown in Iran. *J. Food Compos. Anal.*, 19, 676–680.
- [2] Khoddami, A., Roberts, T.H. 2015. Pomegranate oil as a valuable pharmaceutical and nutraceutical. *Lipid Technol.*, 27, 40-42.
- [3] Mohagheghi, M., Rezaei, K., Labbafi, M., Mousavi, S.M.E. 2011. Pomegranate seed oil as a functional ingredient in beverages, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 113, 730–736.
- [4] Goula, A.M., Lazarides, H.N. 2015. Integrated processes can turn industrial food waste into valuable food by-products and/or ingredients: The cases of olive mill and pomegranate wastes. *J. Food Eng.*, 167, 45-50.
- [5] Goula A.M., Adamopoulos, K.G. 2012. A method for pomegranate seed application in food industries: Seed oil encapsulation. *Food Bioprod process.*, 90, 639–652.
- [6] Cavazos-Garduño, A., Ochoa Flores, A.A., Serrano-Niño, J.C., Martínez-Sanchez, C.E., Beristain, C.I., García, H.S. 2015. Preparation of betulinic acid nanoemulsions stabilized by x-3 enriched phosphatidylcholine. *Ultrason Sonochem.*, 24, 204-213.
- [7] Li, P.H., Lu, W.Ch. 2016. Effects of storage conditions on the physical stability of D-limonene nanoemulsion. *Food Hydrocoll.* 53, 218-224.
- [8] Yang, Y., Marshall-Breton, Ch., Leser, M. E., Sher, A. A., McClements, D. J. 2012.

سورفکتانت در فاز آبی (زمانی که میزان بیش از حد آن استفاده می‌شود) قرار گیرد. از آنجایی که تئوین ۸۰ غلظت بحرانی تشکیل میسل^۱ کمی دارد (کمتر از ۰/۱ میلی مولار) می‌تواند در فاز آبی تشکیل میسل داده و مانع از اکسایش چربی‌ها با تعدادی سازوکار شود: الف) به دام انداختن پرواکسیدان‌ها مانند هیدروپراکسیدها که موجب کاهش آنها در فاز آبی امولسیون می‌شود [۲۵]. ب) افزایش حلالیت آنتی اکسیدان‌ها که موجب افزایش حلالیت آنها در فاز آبی امولسیون می‌شود [۲۶]. ج) با توجه به میزان قابل توجه توکوفرول در روغن هسته انار، تصور می‌شود این ترکیبات می‌توانند میسل‌های کمک سورفکتانت^۲ تشکیل داده که به عنوان یک منبع آنتی اکسیدانی عمل کرده و در زمان مورد نیاز آزاد شده و دوره تاخیر^۳ فرایند اکسایش را افزایش دهند [۲۶]. مورد اخیر توسط واکر و همکاران (۲۰۱۵) که بر روی نانوامولسیون روغن ماهی مطالعه کردند، نیز گزارش شده است [۲۳].

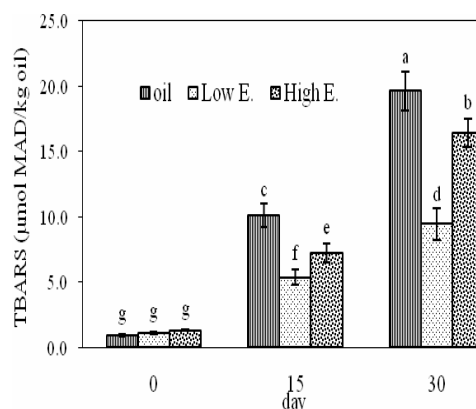


Fig 4 TBRS content in non-emulsified oil and PSO nanoemulsions with SOR= 1.5 produced by low energy and high energy method during 30 days storage at 40 °C.

۴- نتیجه گیری کلی

در این مطالعه توانایی دو روش کم انرژی و پرانرژی در تشکیل نانوامولسیون‌های پایدار روغن هسته انار با یکدیگر مقایسه شد. روش پرانرژی قادر به تشکیل کوچک‌ترین اندازه قطرات (کمتر از ۱۰۰ نانومتر) در $SOR = 1/5$ بود. نانوامولسیون تشکیل شده به روش پرانرژی پایداری انبارمانی بهتری در دماهای پایین نسبت

1. Critical Micelle Concentration (CMC)
2. Surfactant co-micelles
3. Lag Phase

- bactericidal activity. *Ultrason Sonochem.*, 20, 338-344.
- [18] 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.
- [19] Sugumar, S., Singh, S., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N. 2016. Nanoemulsion of orange oil with non ionic surfactant produced emulsion using ultrasonication technique: evaluating against foodspoilage yeast. *Appl Nanosci.*, 6, 113-120.
- [20] Barradas, T. N., Bucco de Campos, V. E., Senna, J.P., Coutinho, C. D. S. C., Tebaldi, B. S., Silva, K. G. H., Mansur, C. R. E. 2015. Development and characterization of promising o/w nanoemulsions containing sweet fennel essential oil and non-ionic surfactants, *Colloid. Surf. A.: Physicochem. Eng. Asp.* 480, 214-221.
- [21] Yang, Y., Leser, M. E., Sher, A. A., McClements, D. J. 2013. Formation and stability of emulsions using a natural small molecule surfactant: Quillaja saponin (Q-Naturale). *Food Hydrocoll.*, 30, 589-596.
- [22] McClements, D. J., Decker, E. A. 2000. Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: Impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food system. *J. Food Sci.*, 65, 1270-1282.
- [23] Walker, R. M., Decker, E. A., McClements, D. J. 2015. Physical and oxidative stability of fish oil nanoemulsions produced by spontaneous emulsification: Effect of surfactant concentration and particle size, *J. Food Eng.* 164, 10-20.
- [24] Waraho, T., McClements, D. J., Decker, E. A. 2011. Mechanisms of lipid oxidation in food dispersions, *Trends Food Sci. Technol.* 22, 3-13.
- [25] Nuchi, C. D., Hernandez, P., McClements, D. J., Decker, E. A. 2002. Ability of lipid hydroperoxides to partition into surfactant micelles and alter lipid oxidation rates in emulsions, *J. Agric. Food Chem.* 50, 5445-5449.
- [26] Kiralan, S. S., Doğu-Baykut, E., Kittipongpittaya, K., McClements, D.J., Decker, E.A., (2014). Increased antioxidant efficacy of tocopherols by surfactant solubilization in oil-in-water emulsions. *J Agric Food Chem.*, 62, 10561-10566.
- Fabrication of ultrafine edible emulsions: Comparison of high-energy and low-energy homogenization methods. *Food Hydrocoll.*, 29, 398-406.
- [9] Saberi, A.H., Fang, Y., McClements, D. J. 2013. Fabrication of Vitamin E-Enriched Nanoemulsions by Spontaneous Emulsification: Effect of Propylene Glycol and Ethanol on Formation, Stability, and Properties. *Food Res. Int.*, 54, 812-820.
- [10] Tabibiazar, M., Davaran, S., Hashemi, M., Homayonirad, A., Rasoulzadeh, F., Hamishehkar, H., Mohammadifar, M. A. 2015. Design and fabrication of a food-grade albumin-stabilized nanoemulsion. *Food Hydrocoll.*, 44, 220-228.
- [11] Kentish, S., Wooster, T., Ashokkumar, M., Balachandran, S., Mawson, R., Simons, L. 2008. The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation. *Innov Food Sci Emerg Technol.*, 9, 170-175.
- [12] Leong, T.S.H., Wooster, T. J., Kentish, S. E., Ashokkumar, M. 2009. Minimising oil droplet size using ultrasonic emulsification. *Ultrason Sonochem.*, 16, 721-727.
- [13] Chang, Y., McClements, D. J. 2014. Optimization of orange oil nanoemulsion formation by isothermal low-energy methods: influence of the oil phase, surfactant, and temperature. *J. Agric. Food Chem.* 62, 2306-2312.
- [14] Chang, Y., McLandsborough, L., McClements, D. J. 2013. Physicochemical Properties and Antimicrobial Efficacy of Carvacrol Nanoemulsions Formed by Spontaneous Emulsification, *J. Agric. Food Chem.* 61, 8906-8913.
- [15] Gulotta, A., Saberi, A. H., Nicoli, M. C., McClements, D. J. 2014. Nanoemulsion-Based Delivery Systems for Polyunsaturated (ω -3) Oils: Formation Using a Spontaneous Emulsification Method, *J. Agric. Food Chem.* 62, 1720-1725.
- [16] Guttoff, M., Saberi, A.H., McClements, D.J. 2015. Formation of vitamin D nanoemulsion-based delivery systems by spontaneous emulsification: factors affecting particle size and stability, *Food Chem.* 171, 117-122.
- [17] Ghosh, V., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N. 2013. Ultrasonic emulsification of food-grade nanoemulsion formulation and evaluation of its

Comparison of low energy and high energy methods in design and fabrication of mixed non-ionic surfactants-stabilized pomegranate seed oil nanoemulsion

Sadeghi, S.¹, Pirouzifard, M.^{2*}, Emam-Djomeh, Z.³

1. Ph.D., Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Urmia University

2. Associated Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Urmia University.

3. Professor, Department of Food Science & Technology, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran

(Received: 2018/05/25 Accepted: 2019/03/10)

Pomegranate seed oil (PSO) is an edible oil extracted from industrial wastes of pomegranate processing presented a wide range of biological effects because of its high puniceic acid and polyphenolic compounds. Due to its low solubility and high oxidation sensitivity, nanoemulsion (NE)-based delivery systems are recommended to use this oil in the food and beverage industries. NEs can be fabricated by high-energy or low-energy methods, which each has advantages and limitations. In this study, we compared a high-energy method (sonication) with a low-energy method (spontaneous emulsification) to form PSO NEs based on mixed non-ionic surfactants (Span 80, Tween 80). The results showed that both methods were able to produce emulsions with ultrafine droplets ($d < 150$ nm) in the surfactant to oil ratio of 1.5. However, the size of droplets for the high energy method (93 ± 5 nm) was significantly lower than the low energy method (166 ± 8). Moreover, the effect of various storage temperatures (4, 25 and 55 °C) on the physical stability of the selected NEs highlighted the stimulated droplets coalescence at higher temperature (55 °C) leading to relatively unstable NEs in contrast to complete stable ones achieved at mild condition (4 °C). Furthermore, the oxidative studying (30 days) showed that NE produced by high energy method was significantly ($p < 0.05$) more sensitive compared to similar counterparts formed by low energy method.

Keyword: Nanoemulsion, Pomegranate seed oil, Spontaneous Emulsification, Sonication, Emulsion Stability.

*Corresponding Author E-Mail Address: k.pirouzifard@yahoo.com