

# بررسی خواص فیزیکومکانیکی پاستیل فراسودمند غنی شده با روغن ماهی درون پوشانی شده در نانوذله کیتوزان-استتاریک اسید به روش امولسیون پیکرینگ

حسین میرزایی مقدم<sup>\*۱</sup>

۱- استادیار گروه آب و خاک دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود

(تاریخ دریافت: ۹۸/۰۴/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۵/۱۴)

## چکیده

اگرچه اثرات مفید روغن ماهی که غنی از اسیدهای چرب امگا ۳ می باشد، شناخته شده است. اما حساسیت بالای آن به اکسیداسیون و ایجاد ترکیبات نامطلوب استفاده از آن را در سامانه های غذایی محدود کرده است. بنابراین هدف از این مطالعه پوشش دهی روغن ماهی با نانوذله کیتوزان-استتاریک اسید به روش امولسیون پیکرینگ و وارد کردن آن در یک سامانه غذایی (پاستیل) و بررسی خواص فیزیکومکانیکی محصول بود. در ابتدا نانوذله کیتوزان-استتاریک اسید به روش خود تجمعی ایجاد شد و نتایج طیف سنجی مادون قرمز، اتصال موفقیت آمیز بین کیتوزان و استتاریک اسید را تأیید کرد. همچنین عکس میکروسکوپ الکترونی روبشی، تشکیل نانوذرات تقریباً کروی شکل را نشان داد. در مرحله بعد امولسیون های پیکرینگ روغن ماهی در غلظتهای متفاوت با استفاده از نانوذله کیتوزان-استتاریک اسید تهیه و در فرمولاسیون پاستیل استفاده شد و در ادامه آزمون پروفایل بافت و همچنین اندازه گیری شاخص های رنگی روی نمونه ها انجام شد. نتایج آزمون پروفایل بافت نشان داد که وجود نانوذله باعث افزایش انعطاف پذیری (از ۸۸/۵٪ به ۹۹/۲٪) و چسبندگی (از ۰/۳۳Ns به ۰/۶۳Ns) و کاهش سختی (از ۱۷۸/۶N به ۱۲۵/۸N) بافت نمونه های پاستیل شد. از طرف دیگر وجود روغن باعث کاهش تمام شاخص های بافتی شد. در مورد ویژگی های رنگی، نانوذله باعث کاهش شاخص های  $L^*$  (از ۵۸/۱۳ به ۵۶/۴۶) و  $a^*$  (از ۶/۵- به ۴/۴-) شد. همچنین نتایج نشان داد که روغن ماهی در ترکیب با نانوذله، شاخص های رنگ را کاهش داد.

**کلید واژگان:** خواص فیزیکومکانیکی، روغن ماهی، پاستیل، نانوذله کیتوزان-استتاریک اسید، امولسیون پیکرینگ

## ۱- مقدمه

خرچنگ می باشد، به دلیل زیست سازگاری بالا مرتباً مورد استفاده قرار گرفته است [۳]. مطالعات قبلی نشان داده است که کیتوزان خاصیت امولسیون کنندگی مناسبی ندارد. اما با اصلاح ساختار آن خاصیت امولسیون کنندگی آن را می توان بهبود داد [۴]. علاوه بر این نتایج تحقیقات قبلی نشان داده است که امولسیون های پیکرینگ در مقایسه با امولسیون های معمول که از سورفکتانت برای پایداری استفاده می کنند، اثر بهتری در کاهش اکسیداسیون روغن ها دارند که این اثر را مربوط به لایه ضخیم ایجاد شده در اطراف قطرات روغن در امولسیون های پیکرینگ مربوط می دانند [۵ و ۷]. عطاریان و همکاران در سال ۲۰۱۹ در تحقیقی نشان دادند که نانوذلهای کیتوزان-استتاریک نسبت به کیتوزان اثر پایدار کنندگی بهتری در امولسیون روغن آفتابگردان در آب داشتند. همچنین این محققین گزارش کردند که پایداری اکسیداتیو امولسیون روغن آفتابگردان پایدار شده با نانوذلهای کیتوزان-استتاریک اسید، بیشتر از امولسیون پایدار شده با توئین ۸۰ بوده است [۷]. با توجه به اینکه استفاده از امولسیون های پیکرینگ به ویژه آن هایی که حاوی روغن های سودمند از جمله روغن ماهی هستند، در سامانه های غذایی کمتر استفاده شده است. بنابراین هدف از این تحقیق پوشش دهی روغن ماهی با استفاده از نانوذلهای کیتوزان استتاریک اسید به روش امولسیون پیکرینگ و در ادامه استفاده از آن در یک محصول پرفرودار همانند پاستیل و بررسی خواص فیزیکی و مکانیکی آن می باشد.

## ۲- مواد و روش ها

### ۲-۱- مواد اولیه

روغن ماهی تهیه شده از شرکت پارس کیلکا امیرآباد بابلسر (حاوی ۲۳ درصد اسید چرب امگا ۳) و اتانول، اسید استیک ۱٪ و سدیم هیدروکسید از شرکت مرک، آلمان خریداری شد. کیتوزان، اسید استتاریک و ۱-تیل-۱-(۳-دی متیل آمینو پروپیل) کربو دی ایمید هیدرو کلرید (EDC) از شرکت سیگما، آلمان تهیه شد. متانول از شرکت اطلس شیمی، ژلاتین از کارخانه ژلاتین حلال قزوین، گلوکز مایع از شرکت چی چست گلوکز ارومیه و شکر از فروشگاه سطح شهر تهیه شدند.

با افزایش آگاهی و شیوع بیماری های مزمن نظیر فشار خون بالا، سرطان، افسردگی، بیماری های قلبی و آلزایمر، مصرف جهانی مکمل های غذایی و محصولات حاوی روغن ماهی به سرعت افزایش یافته است. روغن ماهی، در واقع منبع اصلی امگا ۳ اسیدهای چرب غیر اشباع (PUFA) است. اکثر مزایای روغن-های ماهی، می توانند به دو اسید چرب دوکوزاهگزانوئیک اسید (DHA) و ایکوزاپنتانوئیک اسید (EPA)، نسبت داده شوند. از جمله بیماری هایی که اسیدهای چرب (3-6) در بهبود آن ها نقش دارند شامل بیماری های قلبی-عروقی، سرطان سینه و پروستات، میگرن و انواع سردردها، استرس، نا باروری، بیماری های گوارشی، اختلالات بینایی، سکت، دیابت، اختلالات روده ای-معه ای می باشند. اسیدهای چرب (3-6) به دلیل کاربردهای درمانی و تغذیه ای زیادی که دارند در سال های اخیر مورد توجه قرار گرفته اند. اما حساسیت بالای آن ها به اکسیداسیون استفاده از آن ها را در مواد غذایی دچار مشکل کرده است. روش های مختلفی برای محافظت از این ترکیبات از جمله استفاده از درون-پوشانی وجود دارد [۱]. امولسیون های روغن در آب به عنوان وسیله ای برای درون پوشانی ترکیبات لیپوفیلی از جمله چربی های عملکردی و سایر ترکیبات زیست فعال به طور گسترده در زمینه غذا، تغذیه و دارو مورد استفاده قرار می گیرند. انواع مختلف امولسیفایرها می توانند برای تثبیت سینتیکی امولسیون های غذا استفاده شوند، اما سورفکتانت های معمولی اثرات نامطلوب بر ایمنی غذا دارند. در سال های اخیر، علاقه به استفاده از ذرات یا نانو ذرات سازگار با مواد غذایی برای تثبیت امولسیون های غذایی افزایش یافته است. امولسیون های تثبیت شده با مواد جامد که معمولاً به عنوان امولسیون پیکرینگ شناخته می شوند، از ذرات جامد با آگریزی متوسط استفاده می کنند که به شدت در میان دو مایع غیر قابل امتزاج جذب می شوند تا مانع در برابر جمع شدن قطرات امولسیون شوند [۲]. در دهه گذشته، دامنه ی وسیعی از نانوذرات پلی ساکارییدی برای درون پوشانی ترکیبات زیستی مورد تحقیق قرار گرفته است. در میان ساختارهای پلی ساکارییدی، کیتوزانی که توسط استیلن زدایی کیتین تولید می شود و ترکیب اصلی سخت پوستان، مانند میگو و

## ۲-۲- روش‌های آزمایش

## ۲-۲-۱- آماده سازی نانوذله کیتوزان-اسید استتاریک

تهیه نانوذله کیتوزان-اسید استتاریک به روش فراصوت و اتصال اسید استتاریک به کیتوزان با تشکیل پیوندهای آمیدی با یک واکنش دهنده (۱-تیل-۳-دی متیل آمینو پروپیل) کربو دی ایمید هیدرو کلرید (EDC)) انجام شد. در ابتدا، ۱ گرم کیتوزان در ۱۰۰ میلی لیتر اسید استیک آبی ۱٪ حجمی/حجمی حل شد. سپس محلول حاصل تحت امواج فراصوت قرار داده شد. در ادامه ۱۰۰ میلی گرم EDC با ۲۵۰ میلی گرم اسید استتاریک به همراه ۵ میلی لیتر اتانول مخلوط شد و سپس قطره قطره به محلول کیتوزان اضافه شد. سپس محلول به مدت ۲۴ ساعت مخلوط و هم زده شد. بعد از آن pH محلول با استفاده از سدیم هیدروکسید ۱ مولار به منظور رسوب نانوذله روی ۸/۵-۹ تنظیم شد. سپس محلول به منظور رسوب نانوذله‌ها در سرعت ۴۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد. در پایان رسوب نانوذله به دست آمده برای حذف مواد واکنش نداده و همچنین EDC توسط اتانول و آب مقطر سه مرتبه شسته شد [۷].

## ۲-۲-۲- آزمون FT-IR

در این پژوهش برای تأیید تشکیل ساختار نانوذله‌ها، طیف سنجی مادون قرمز در دمای ۲۰ درجه سلسیوس و در دامنه  $500\text{ cm}^{-1}$  تا ۴۰۰۰ انجام داده شد [۳]. به این منظور مقداری از نانوذله‌های کیتوزان-اسید استتاریک خشک شده به همراه اسید استتاریک و کیتوزان با پودر خالص KBr مخلوط شدند و سپس از آن‌ها قرص‌های فشرده تهیه گردید. طیف نمونه‌های مورد نظر با دستگاه اسپکتروسکوپی مادون قرمز (مدل Jascow 430 ساخت کشور ژاپن) اندازه‌گیری و بررسی شد.

## ۲-۲-۳- آزمون میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

از میکروسکوپ الکترونی روبشی برای مطالعه مورفولوژی ساختار نانوذرات استفاده شد. به این صورت که ابتدا چند قطره از محلول نانوذله روی لام ریخته شد و در دمای محیط خشک و در انتها نمونه‌ها با طلا پوشش داده شدند، سپس از دستگاه SEM (مدل KYKY- EM 3200 ساخت کشور چین) برای عکس برداری از نمونه‌ها استفاده شد.

## ۲-۲-۴- آماده سازی امولسیون‌های پیکرینگ روغن ماهی

## در آب

برای تهیه امولسیون‌های پیکرینگ، مقادیر معینی از روغن ماهی و محلول نانوذله تهیه و به وسیله همزن دور بالا (به مدت دو دقیقه) از روش اصلاح شده‌ی موانگی و همکاران، استفاده شد [۸].

## ۲-۲-۵- اندازه گیری میانگین اندازه قطرات

برای اندازه‌گیری اندازه قطرات روغن پس از ۳۰ دقیقه از تهیه امولسیون، یک قطره از نمونه امولسیون با سمپلر برداشته و به آرامی بر روی لام شیشه‌ای ریخته شد و سپس با استفاده میکروسکوپ نوری (مدل GX Microscopes، ساخت کشور استرالیا) و دوربین دیجیتال ۲ مگا پیکسل عکس گرفته شد. در ادامه از نرم افزار Image J برای تخمین میانگین اندازه قطرات استفاده شد [۹].

## ۲-۲-۶- آزمون میکروسکوپ اسکن لیزری کانفوکال

## (CLSM)

میکروسکوپ اسکن لیزری کانفوکال (هیدلبرگ، ساخت کشور آلمان) برای نمایش بهتر ساختار فضایی قطرات امولسیون پیکرینگ استفاده شد. قبل از آماده سازی امولسیون، نانوذله کیتوزان-اسید استتاریک با FITC مطابق روش عطاریان و همکاران (۲۰۱۹) واکنش داده شد [۷]. در ادامه امولسیون روغن ماهی با استفاده از نانوذله کیتوزان-اسید متصل شده به FITC تهیه شد. قبل از تهیه امولسیون به روغن ماهی محلول Nile red اضافه شد. در ادامه یک قطره از امولسیون رنگ آمیزی شده روی لام قرار داده شد و با استفاده از میکروسکوپ کانفوکال از آن عکس تهیه شد. برای تهیه عکس فلورسنت لیزر آرگون با ۵۳۲ نانومتر برای Nile red و ۴۸۸ نانومتر برای FITC استفاده شد.

## ۲-۲-۷- روش تهیه پاستیل

بعد از انجام آزمایشات اولیه، اجزای فرمولاسیون مخلوط پایه پاستیل‌ها، شامل ۱۳۲ گرم ژلاتین، ۳۳۰ گرم آب مقطر، ۶۶ گرم شکر، ۱۳۲ گرم گلوکز مایع در حمام آب گرم (دمای ۷۰ درجه سلسیوس) به مدت یک ساعت تهیه شد. سپس برای تهیه هر یک از تیمارهای مورد بررسی، طبق جدول (۱)، به ۹۰ گرم از مخلوط حاضر در همین شرایط، مقادیر معینی از امولسیون تهیه شده

ابعاد  $20 \times 10 \times 10$  mm برش خورده و به مدت ۴ ساعت در دمای محیط قرار داده شدند. در پایان نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش داخل زیپ کیپ‌های پلاستیکی در دمای محیط نگهداری شدند.

افزوده شد. پس از ۱۵ دقیقه، نمونه‌ها در قالب‌های سیلیکونی به ابعاد  $80 \times 50 \times 20$  mm ریخته شدند. سپس به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند و پس از آن نمونه‌ها در

Table 1 Different compounds of the treatments

| Treatment                 | Distilled water (gr) | Nanogel (gr) | Fish oil (gr) | Blended (gr): Glucose (132gr)+Gelatin (132gr)+Sugar (66gr) Distilled water (330gr) |
|---------------------------|----------------------|--------------|---------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| Control                   | 10                   | 0            | 0             | 90                                                                                 |
| 2% fish oil               | 10                   | 0            | 2             | 90                                                                                 |
| 1% fish oil+ 0.1% nanogel | 0                    | 10           | 1             | 90                                                                                 |
| 2% fish oil+ 0.1% nanogel | 0                    | 10           | 2             | 90                                                                                 |
| 3% fish oil+ 0.1% nanogel | 0                    | 10           | 3             | 90                                                                                 |
| 0.1% nanogel              | 0                    | 0            | 10            | 90                                                                                 |

### ۳-۲-۷-۲-۲-ارزیابی رنگ

به منظور اندازه‌گیری پارامترهای رنگی نمونه‌های پاستیل، از هر تیمار سه قطعه به طور تصادفی انتخاب شده و در جعبه مخصوص عکس‌برداری قرار داده شدند و تصاویر تهیه گردید و مراحل پردازش تصویر با استفاده از نرم افزار فتوشاپ انجام شد. رنگ نمونه‌ها بر اساس سه مولفه  $L^*$ ،  $a^*$  و  $b^*$  قرائت شد که  $L^*$  بیانگر روشنایی است و دامنه آن از ۰ تا ۱۰۰ می‌باشد.  $a^*$  و  $b^*$  به ترتیب بیانگر قرمزی و زردی ترکیبات رنگی می‌باشند که از ۱۲۰- تا ۱۲۰+ تغییر می‌کنند. در ادامه با توجه به روابط (۳-۱)، (۳-۲) و (۳-۳)، به ترتیب کروما<sup>۶</sup> (غلظت رنگ)، زاویه هیو<sup>۷</sup> (شدت رنگ) و اختلاف رنگ کل<sup>۸</sup> ( $\Delta E$ ) برای هر نمونه محاسبه شد [11].

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (1-3)$$

$$H^\circ = \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (2-3)$$

$$(3-3)$$

$$\Delta E = \sqrt{(L_0 - L^*)^2 + (a_0 - a^*)^2 + (b_0 - b^*)^2}$$

که در این روابط،  $C^*$ : کروما،  $H^\circ$ : زاویه هیو،  $\Delta E$ : اختلاف رنگ کل و  $a_0$ ،  $b_0$  و  $L_0$  معرف مولفه‌های رنگ نمونه شاهد می‌باشند.

### ۳-۲-۷-۱-بررسی ساختار میکروسکوپی

پس از آماده سازی و خشک شدن نمونه‌های مختلف پاستیل، برای بررسی ساختار میکروسکوپی و همچنین نحوه پراکندگی قطرات روغن، از سطح نمونه‌های پاستیل یک برش نازک با میکروتوم تهیه و با میکروسکوپ نوری (مدل GX Microscopes، ساخت کشور استرالیا) و دوربین دیجیتال ۲ مگا پیکسل عکس گرفته شد.

### ۳-۲-۷-۲-ارزیابی خواص فیزیکومکانیکی پاستیل

#### ۳-۲-۷-۲-۱-آزمون پروفایل بافت

در این پژوهش به منظور آنالیز پروفایل بافت (TPA<sup>۱</sup>) و تعیین ویژگی‌های بافت نمونه‌های پاستیل تولیدی، از دستگاه آزمون مواد ساخت ایران، شرکت ستنام استفاده شد. بدین منظور، از هر تیمار نمونه‌هایی در ابعاد  $20 \times 10 \times 10$  mm تهیه شده و هر یک از نمونه‌ها در دو سیکل رفت و برگشتی (دو رفت و دو برگشت)، توسط پروب سیلندری به قطر ۶۰ mm و سرعت حرکت ۶۰ mm/min تا ۸۰ درصد ارتفاع اولیه فشرده شده، سپس فشار زدایی شدند. برای هر تیمار ۶ تکرار در نظر گرفته شد. سپس با استفاده از داده‌های مربوط به نمودارهای نیرو-تغییر شکل بدست آمده از حافظه دستگاه، منحنی‌های نیرو-زمان برای هر یک از نمونه‌ها ترسیم شده و با استفاده از این منحنی‌ها ویژگی‌های بافتی سختی<sup>۲</sup>، قابلیت جویدن<sup>۳</sup>، انعطاف‌پذیری<sup>۴</sup> و چسبندگی<sup>۵</sup> هر نمونه تعیین شد.

1. Texture profile analysis
2. Hardness
3. Chewiness
4. Springiness
5. Adhesion

6. Chroma  
7. Hue angle  
8. Total color difference

کیتوزان، قسمتی از گروه‌های آمین آزاد کیتوزان به گروه‌های کربوکسیل استتاریک اسید با استفاده از حد واسط EDC متصل شدند. به منظور تأیید باند ایجاد شده بین گروه آمین کیتوزان و کربوکسیل اسید استتاریک طیف‌های حاصل از دستگاه طیف سنج FT-IR استفاده شد. در شکل (۱) طیف‌های FT-IR مربوط به کیتوزان، اسید استتاریک و نانوذلهای کیتوزان-اسید استتاریک نشان داده شده است. در شکل (۱-a) طیف کیتوزان، جذب در ناحیه  $3500-3400\text{ cm}^{-1}$  را نشان می‌دهد که این مربوط به گروه هیدروکسیل کیتوزان می‌باشد. در  $2875\text{ cm}^{-1}$  پیک مربوط به ارتعاش کششی گروه‌های  $\text{CH}_2$  است. در  $2137$  و  $1656\text{ cm}^{-1}$  به ترتیب پیک‌ها مربوط به ارتعاشات کششی گروه‌های  $\text{N}-$  و  $\text{N}-\text{C}$  مشاهده H آمید کیتوزان (گروه‌های آمین دی استیل نشده) مشاهده می‌شود. پیک در  $1454\text{ cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاشات  $\text{C}-\text{H}$  موجود در حلقه‌های قند است.

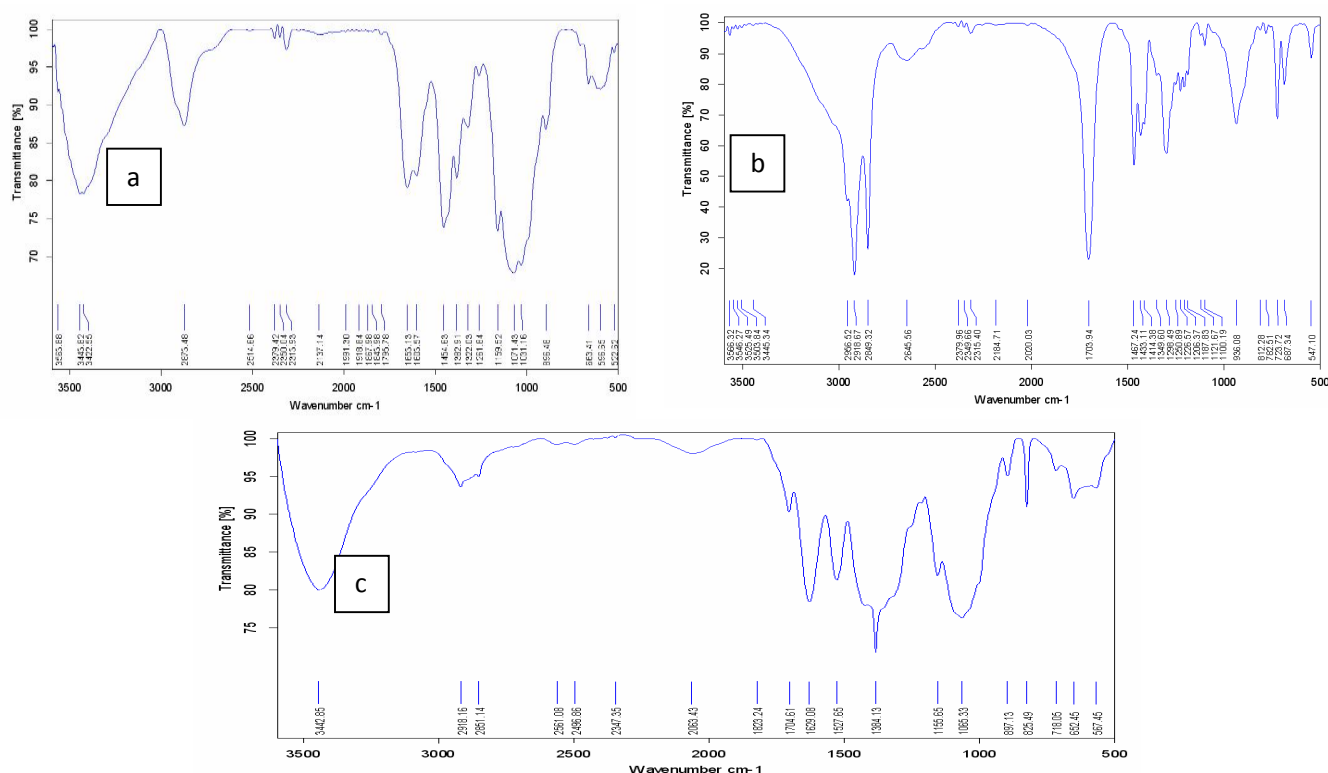
### ۳-۳- تجزیه داده‌ها

تمام آزمایشات به جز SEM, CLSM و FTIR حد اقل در ۳ تکرار صورت پذیرفت. میانگین و انحراف استاندارد (SD) با استفاده از نرم افزار مایکروسافت اکسل محاسبه شد. آنالیز واریانس یک طرفه و همچنین، آزمون چند دامنه‌ای دانکن برای مقایسه اختلاف‌ها در سطح ۵ درصد با نرم افزار SPSS 21 محاسبه گردید.

### ۳- نتایج و بحث

#### ۳-۱- بررسی نانوذلهای کیتوزان-اسید استتاریک

در مرحله اول این تحقیق نانوذلهای با مکانیسم خود تجمعی، با استفاده از کیتوزان اصلاح شده تهیه گردید. به منظور اصلاح

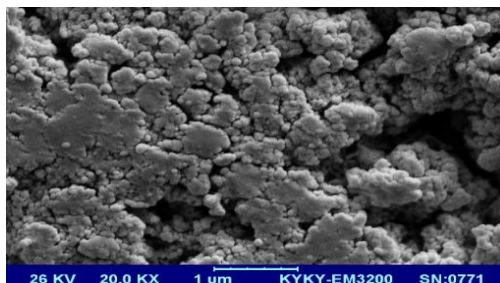


**Fig 1** Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis obtained for chitosan (a), stearic acid (b) and chitosan-stearic acid nanogel (c).

به ارتعاش کششی  $\text{C}=\text{O}$  گروه کربوکسیل اسید چرب، پیک  $\text{cm}^{-1}$   $1467$  مربوط به ارتعاش خمشی  $\text{C}-\text{H}$  گروه‌های  $\text{CH}_2$  و گروه  $\text{CH}_3$  اسید چرب، پیک  $\text{cm}^{-1}$   $1261$  ارتعاش کششی  $\text{C}-\text{O}$

در شکل (۱-b) طیف مربوط به استتاریک اسید نشان داده شده است. پیک‌های شناسایی شده در  $2918$  و  $2849\text{ cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاش کششی  $\text{C}-\text{H}$  گروه‌های  $\text{CH}_2$ . پیک  $\text{cm}^{-1}$   $1704$  مربوط

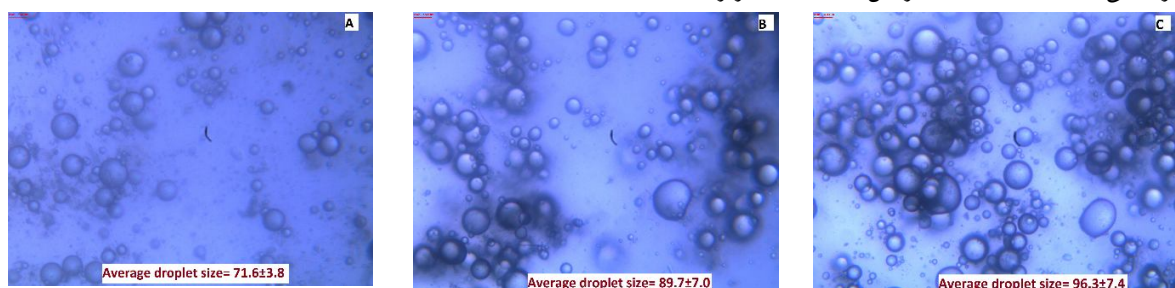
کیتوزان می‌باشد که این باعث آرایش و تجمع قسمت‌های آبریز به سمت مرکز و قسمت‌های آبدوست به سمت بیرون و در نتیجه تشکیل ساختاری مجتمع در حد نانومتر شده است. این نتایج با یافته‌های مطالعات دیگر محققین مطابقت دارد [۳ و ۵].



**Fig 2** Scanning electron microscopy (SEM) micrograph of chitosan-stearic acid nanogel.

### ۲-۳- اندازه ذرات امولسیون

در مرحله بعدی، نانوزل‌های کیتوزان-استتاریک اسید به عنوان پایدار کننده امولسیون روغن ماهی در آب استفاده شد. در این قسمت اثر میزان روغن ماهی بر اندازه قطرات امولسیون در غلظت نانوزل ثابت بررسی شد. لازم به ذکر است که اندازه قطرات روغن می‌تواند بر خصوصیات فیزیکی پاستیل موثر باشد. در شکل ۳ میانگین اندازه ذرات و همچنین عکس میکروسکوپ نوری امولسیون‌های پیکرینگ پایدار شده با نانوزل کیتوزان-استتاریک اسید در غلظت‌های مختلف روغن نشان داده شده است.



**Fig 3** Average droplet size and optical microscopic images of the emulsions stabilized by CS-SA nanogels with 10% (A), 20% (B) and 30% (C) fish oil after 30 min.

### ۲-۳-۱- آزمون میکروسکوپ اسکن لیزری کانفوکال (CLSM)

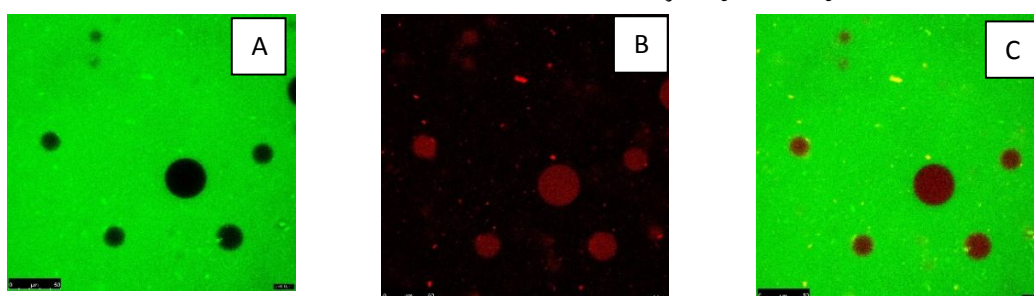
ساختار مورفولوژی امولسیون‌های پیکرینگ، شامل ویژگی‌های بین سطحی (ترکیب و ضخامت) روی پایداری فیزیکی موثر است. آزمون میکروسکوپ اسکن لیزری کانفوکال برای نشان

گروه کربوکسیل اسید چرب، پیک  $936\text{ cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاش خمشی O-H اسید کربوکسیلیک، و پیک  $687\text{ cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاش خمشی C-H است [13]. در شکل (۱-۲) طیف مربوط به نانوزل کیتوزان-استتاریک اسید نشان داده شده است. وجود پیک در ناحیه  $1629$  مربوط به ارتعاشات گروه‌های آمید آمین‌های استیل شده [۱۴] و همچنین پیوندهای آمید جدید تشکیل شده در اثر اتصال بین کیتوزان و استتاریک اسید می‌باشد. وجود پیک در ناحیه  $1527$  به ارتعاش NH گروه آمید نوع دوم مربوط است [۱۵] که می‌تواند در نتیجه تشکیل پیوند بین کیتوزان و استتاریک اسید باشد. در طیف مربوط به نانوزل یک پیک در ناحیه  $1704$  مشاهده می‌شود که همین پیک در طیف مربوط به استتاریک اسید (مربوط به ارتعاش کششی C=O) نیز مشاهده می‌گردد. این پیک نشان می‌دهد که تعدادی از گروه‌های کربوکسیلیک اسید استتاریک اسید با برهمکنش‌های الکترواستاتیکی به زنجیره کیتوزان متصل شده‌اند. عطاریان و همکاران در سال ۲۰۱۹ نیز نتایج مشابه با کار حاضر را گزارش کردند [۷].

در شکل (۲) عکس میکروسکوپ الکترونی روبشی مربوط به نانوزل‌های کیتوزان-استتاریک اسید نشان داده شده است. همان‌گونه که در شکل مشاهده می‌شود رشته‌های کیتوزان-استتاریک اسید توانسته‌اند با تجمع در کنار یکدیگر ذراتی در حدود  $100$  نانومتر ایجاد کنند. تشکیل ذرات نسبتاً کروی شکل توسط رشته‌های کیتوزان-استتاریک اسید احتمالاً به دلیل اتصال زنجیره‌های غیر قطبی استتاریک اسید و افزایش خاصیت آبریزی ساختار

نتایج نشان می‌دهد که با افزایش میزان روغن میانگین اندازه قطرات افزایش یافته است. این یافته با نتایج مطالعات محققین دیگر نیز در تطابق می‌باشد [۸ و ۹]. علاوه بر این شکل (۳) نشان می‌دهد که با افزایش میزان روغن تراکم قطرات روغن در امولسیون بیشتر شده است.

روی سطح قطرات یک لایه تشکیل داده است که می‌تواند یک مانع فضایی در مقابل کووالانس ایجاد کند. علاوه بر این می‌توان مشاهده کرد که نانوذلهای کیتوزان یک شبکه متراکم و پیوسته در فضای بین قطرات روغن نیز ایجاد کرده‌اند. بنابراین می‌توان گفت که در این نوع امولسیون پیکرینگ ممانعت فضایی ایجاد شده به صورت تک لایه و ساده نیست، بلکه یک شبکه از ذرات جذب شده در سطح بین روغن و آب می‌باشد که باعث ممانعت فضایی شده است. یافته‌های این تحقیق با مطالعات دیگران مطابقت دارد [۱۷ و ۱۶].



**Fig 4** CLSM images of the chitosan-stearic acid nanogel nanogels-stabilized Pickering emulsions at 20% oil fraction: CS-SA nanogels was stained by FITC (green) excited at 488 nm (A); fish oil was stained with Nile Red (red) excited at 488 nm (B); C was combined image of A and B.

شده است. لازم به ذکر است که مشاهده چشمی نیز نشان داد که در نمونه پاستیل حاوی روغن بدون نانوذله، یک لایه روغن ماهی در سطح رویی پاستیل ایجاد شده بود در صورتیکه این لایه روغنی در مورد هیچکدام از نمونه‌های دیگر مشاهده نشد. با توجه به شکل (۵) مشاهده می‌شود که در نمونه‌های حاوی روغن ماهی پایدار شده با نانوذله کیتوزان-استتاریک اسید، قطرات روغن در بافت پاستیل به طور پراکنده پخش شده‌اند. نکته قابل توجه در شکل (۵) مربوط به نمونه پاستیل حاوی نانوذله بدون روغن ماهی می‌باشد. با مقایسه این نمونه با نمونه پاستیل شاهد، مشاهده می‌شود که در نمونه حاوی نانوذله یکسری نواحی تیره که تقریباً به صورت رشته‌ای هستند وجود دارد. این نواحی تیره احتمالاً به دلیل تجمع رشته‌های کیتوزان-استتاریک اسید ایجاد شده است.

### ۳-۳- خواص فیزیکومکانیکی پاستیل‌های غنی

#### شده با روغن ماهی

##### ۱-۳-۳- پراکندگی قطرات روغن در بافت

پس از تهیه نمونه‌های پاستیل مختلف، به منظور بررسی میزان پراکندگی روغن و نانوذله در نمونه‌ها از سطح نمونه‌ها با میکروسکوپ نوری عکس برداری انجام شد. در شکل (۵) عکس‌های میکروسکوپ نوری حاصل از سطح نمونه‌های مختلف پاستیل نشان داده شده است. با توجه به شکل (۵) مشاهده می‌شود که در نمونه حاوی ۲ درصد روغن ماهی بدون نانوذله، روغن در سطح پاستیل تجمع پیدا کرده است. این نتیجه نشان می‌دهد که ژلاتین نتوانسته پراکندگی قطرات روغن در محیط را پایدار کند و به تدریج قطرات روغن از بافت داخلی پاستیل جدا

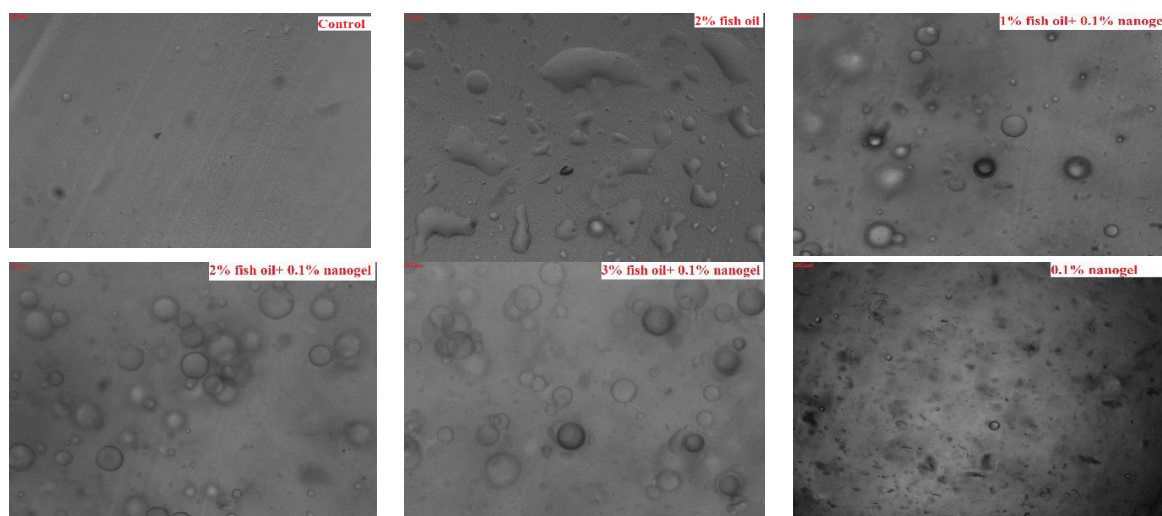


Fig 5 Surface microscopic images of different gummy candy samples.

### ۳-۲-۳-آزمون پروفایل بافت

در شکل (۶) نتایج حاصل از آزمون پروفایل بافت نمونه‌های مختلف پاستیل که شامل سختی، انعطاف پذیری، قابلیت جویدن و چسبندگی است، نشان داده شده است. با توجه به شکل (۶-ا)، مشاهده می‌شود که سختی نمونه شاهد که تنها بسپار ژلاتین در آن وجود داشته از تمام نمونه‌ها بیشتر بوده است. نتایج حاصل از سختی نشان می‌دهد که با افزودن روغن ماهی و نانوزل کیتوزان سختی نمونه‌ها کاهش یافته است. با مقایسه دو نمونه حاوی ۲٪ روغن ماهی مشاهده می‌شود که نانوزل باعث کاهش اثر روغن بر میزان سختی نمونه‌ها شده است. این نتیجه نشان می‌دهد که استفاده از روغن ماهی بدون پوشش دهی اولیه باعث سست شدن بافت پاستیل و به دنبال آن کاهش سختی شده است.

در مورد نتایج انعطاف‌پذیری (شکل ۶-ب) مشاهده می‌شود که افزودن نانوزل کیتوزان به ساختار پاستیل باعث افزایش معنی‌دار خاصیت انعطاف‌پذیری در مقایسه با نمونه شاهد شد و علاوه بر این افزودن روغن به نمونه‌ها باعث کاهش خاصیت انعطاف‌پذیری شده است. همان‌طور که در شکل (۶-ج) نشان داده شده است، با افزودن روغن ماهی و نانوزل، قابلیت جویدن

نمونه‌ها کاهش یافته است و با افزایش میزان روغن، قابلیت جویدن، کاهش بیشتری داشته است. روند مشاهده شده در مورد ویژگی قابلیت جویدن تقریباً مشابه ویژگی سختی نمونه‌هاست. شباهت روند این دو ویژگی احتمالاً به دلیل همبستگی بالای آن‌ها می‌باشد. همچنین با توجه به شکل (۶-د) با افزودن فقط نانوزل کیتوزان به نمونه‌ها، چسبندگی آن‌ها افزایش یافته است و این در صورتی است که افزودن روغن به طور معنی‌داری باعث کاهش چسبندگی نمونه‌ها شده است. بیشتر تحقیقات در زمینه اثر ترکیب کیتوزان و ژلاتین بر خواص مکانیکی در مورد فیلم‌های خوراکی می‌باشد و به طور مشخص در مورد پاستیل مشاهده نشد.

به همین دلیل تحقیقات انجام شده در مورد فیلم‌های خوراکی که تقریباً نزدیک‌ترین حالت به بافت پاستیل را دارند برای تفسیر نتایج مورد استفاده قرار گرفت. از جمله این تحقیقات، بنتایب و همکاران (۲۰۱۴) در بررسی خواص مکانیکی فیلم‌های ژلاتین/کیتوزان، گزارش کردند که فیلم‌های حاصل از ژلاتین به تنهایی استحکام بیشتر و انعطاف‌پذیری کمتری نسبت به فیلم کیتوزانی داشت. همچنین اضافه شدن کیتوزان به فیلم‌های ژلاتینی باعث کاهش سفتی و افزایش انعطاف‌پذیری شد.

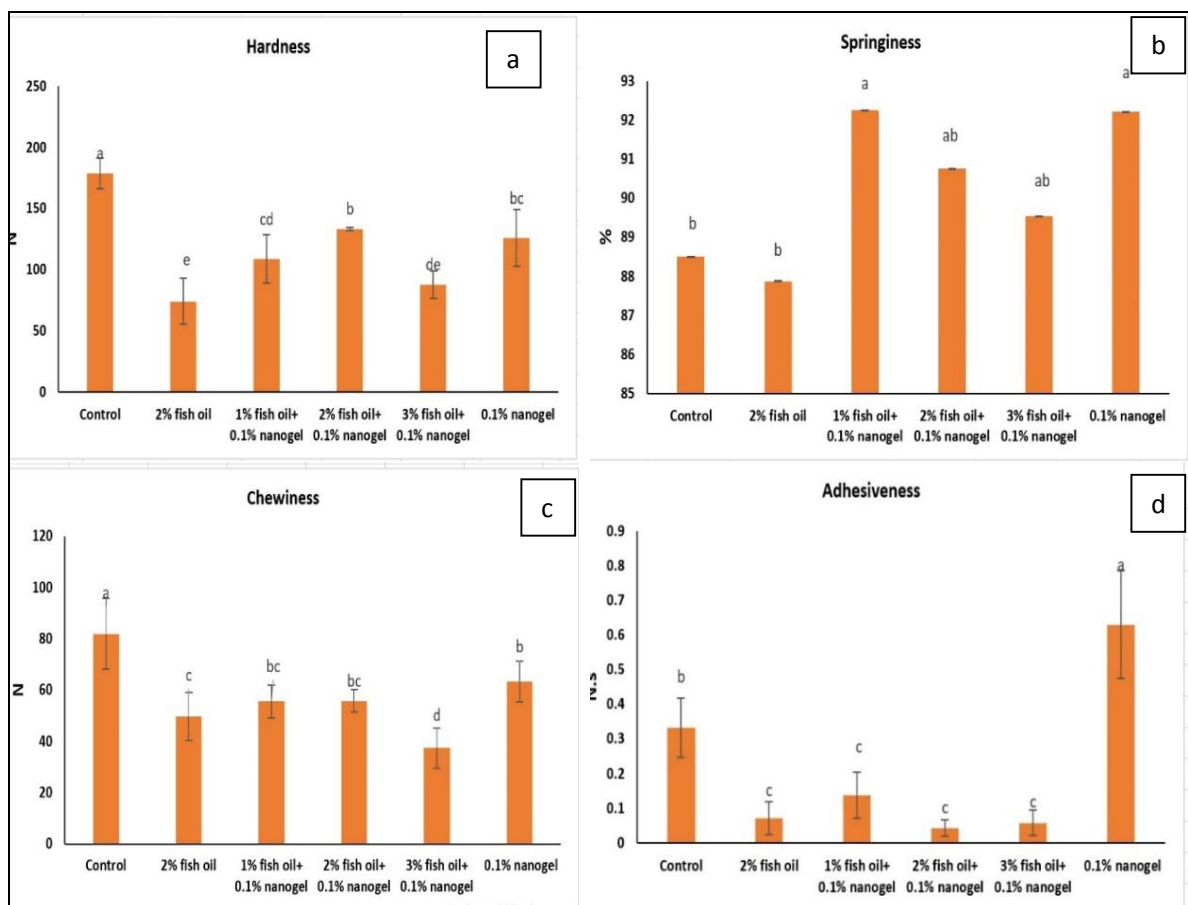


Fig 6. Hardness, springiness, chewiness and adhesiveness of gummy candy samples.

ناهمگن شدن ساختار و همچنین اثر منفی بر نیروهای چسبندگی ساختار مربوط دانستند [۱۱].

### ۳-۳-۳- آزمون رنگ

نتایج آزمون رنگ نمونه‌های مختلف پاستیل در جدول (۲) نشان می‌دهد که اضافه شدن نانوذله به ساختار پاستیل در مقایسه با نمونه شاهد تنها در مورد شاخص روشنایی ( $L^*$ ) و  $a^*$  اثر معنی‌داری داشته است و باعث کاهش معنی‌دار این شاخص‌ها در سطح ۵ درصد شده است. لازم به ذکر است که مقادیر مثبت شاخص  $a^*$  معادل رنگ قرمز و مقادیر منفی معادل رنگ سبز می‌باشد. این نتیجه نشان می‌دهد که نانوذله میزان رنگ سبز پاستیل را کاهش داده است. نتایج مربوط به شاخص روشنایی در تحقیق حاضر با نتایج محققین پیشین، مبنی بر بیشتر بودن شاخص روشنایی فیلم‌های ژلاتینی در مقایسه با فیلم‌های کیتوزانی در تطابق است [۱۲].

این محققین استحکام بیشتر و انعطاف‌پذیری کمتر فیلم‌های ژلاتینی را به شبکه متراکم‌تر ایجاد شده توسط ژلاتین مرتبط دانستند. بدین صورت که زمانیکه کیتوزان با ژلاتین ترکیب می‌شود به دلیل بر هم‌کنش بین این دو بسیار، پیوندهای هیدروژنی بین بسپارهای ژلاتین کاهش یافته و در واقع کیتوزان به عنوان یک روان‌ساز عمل کرده که این باعث انعطاف‌پذیری بیشتر شده است [۱۲]. این نتایج در تطابق با یافته‌های مربوط به سختی و انعطاف‌پذیری تحقیق حاضر می‌باشد. در زمینه اثر روغن بر خصوصیات بافتی فیلم‌های خوراکی تحقیقات مختلفی انجام شده است. از جمله والنزولا و همکاران (۲۰۱۳) در بررسی اثر روغن آفتابگردان بر خصوصیات فیزیکی فیلم ترکیبی کیتوزان و پروتئین گزارش کردند که روغن باعث کاهش استحکام فیلم‌ها شد. این محققین کاهش استحکام فیلم‌ها را در اثر اضافه شدن روغن به

Table 2 Color parameters of gummy candies

| Treatment                 | L*                            | a*                            | b*                             | $\Delta E$                   | Hue Angle                      | Chroma                         |
|---------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Control                   | 58.13 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup> | -6.50 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup> | 52.86 $\pm$ 0.75 <sup>bc</sup> | -                            | 95.58 $\pm$ 2.36 <sup>a</sup>  | 53.15 $\pm$ 0.94 <sup>bc</sup> |
| 2% fish oil               | 56.60 $\pm$ 0.60 <sup>b</sup> | -4.53 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup> | 54.20 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>  | 2.17 $\pm$ 0.4 <sup>d</sup>  | 94.78 $\pm$ 0.12 <sup>ab</sup> | 54.38 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>  |
| 1% fish oil+ 0.1% nanogel | 55.93 $\pm$ 0.80 <sup>b</sup> | -3.00 $\pm$ 0.52 <sup>c</sup> | 53.40 $\pm$ 0.40 <sup>ab</sup> | 3.26 $\pm$ 0.17 <sup>c</sup> | 93.21 $\pm$ 0.59 <sup>bc</sup> | 53.48 $\pm$ 0.37 <sup>ab</sup> |
| 2% fish oil+ 0.1% nanogel | 54.40 $\pm$ 0.91 <sup>c</sup> | -1.73 $\pm$ 0.50 <sup>d</sup> | 52.06 $\pm$ 0.90 <sup>c</sup>  | 5.25 $\pm$ 0.56 <sup>b</sup> | 91.91 $\pm$ 0.56 <sup>cd</sup> | 52.09 $\pm$ 0.89 <sup>c</sup>  |
| 3% fish oil+ 0.1% nanogel | 53.60 $\pm$ 0.91 <sup>c</sup> | -0.46 $\pm$ 0.50 <sup>c</sup> | 50.46 $\pm$ 0.30 <sup>d</sup>  | 7.01 $\pm$ 0.71 <sup>a</sup> | 90.53 $\pm$ 0.57 <sup>d</sup>  | 50.47 $\pm$ 0.30 <sup>d</sup>  |
| 0.1% nanogel              | 56.46 $\pm$ 0.94 <sup>b</sup> | -4.40 $\pm$ 0.69 <sup>b</sup> | 52.46 $\pm$ 0.23 <sup>bc</sup> | 2.06 $\pm$ 0.63 <sup>d</sup> | 94.79 $\pm$ 0.76 <sup>ab</sup> | 52.65 $\pm$ 0.20 <sup>bc</sup> |

Values with different letters in same column are significantly different,  $p < 0.05$ .

## ۴- نتیجه گیری

در این تحقیق روش امولسیون پیکرینگ با استفاده از پایدار کننده نانوذله کیتوزان-استئاریک اسید، برای درون پوشانی روغن ماهی و در ادامه غنی سازی پاستیل استفاده شد. نتایج نشان داد که درون پوشانی روغن ماهی با این روش به خوبی باعث قرار گیری روغن ماهی در بافت پاستیل شد. علاوه بر این درون پوشانی با نانوذله اگرچه سختی بافت پاستیل را کاهش داد اما از طرف دیگر باعث بهبود خاصیت انعطاف پذیری شد. با توجه به نسبتاً آسان بودن این روش درون پوشانی پیشنهاد می شود در مورد محصولات دیگر نیز استفاده شود.

## ۵- منابع

- [1] Kaushik, P., Dowling, K., Barrow, C. J., & Adhikari, B. 2015. Microencapsulation of omega-3 fatty acids: A review of microencapsulation and characterization methods. Journal of functional foods, 19, 868-881.
- [2] Aveyard, R., Binks, B. P., & Clint, J. H. 2003. "Emulsions stabilised solely by colloidal particles". Advances in Colloid and Interface Science, 100, 503-546.
- [3] Khalili, S. T., Mohsenifar, A., Beyki, M., Zhavah, S., Rahmani-Cherati, T., Abdollahi, A., & Tabatabaei, M. 2015. Encapsulation of Thyme essential oils in chitosan-benzoic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against Aspergillus flavus. LWT-Food Science and Technology, 60(1), 502-508.
- [4] Elsabee, M. Z., Morsi, R. E., & Al-Sabagh, A. M. 2009. Surface active properties of chitosan and its derivatives. Colloids and

در مورد اثر روغن به تنهایی بر شاخص های رنگی نمونه های پاستیل مشاهده می شود که اضافه شدن ۲ درصد روغن ماهی به بافت پاستیل باعث تغییر معنی دار شاخص های روشنایی،  $a^*$  و  $b^*$  و کروما در مقایسه با نمونه شاهد شده است (جدول ۲). اثر روغن بر شاخص های روشنایی و  $a^*$  کاهش و بر شاخص  $b^*$  و کروما افزایشی بوده است. والنزولا و همکاران (۲۰۱۳) در بررسی اثر روغن آفتابگردان بر خواص فیزیکی فیلم کیتوزان-پروتئین بیان کردند که روغن می تواند باعث کاهش شاخص  $a^*$  و افزایش شاخص های  $b^*$  و کروما شود [۱۱] که در تطابق با مطالعه حاضر است. با توجه به جدول (۲) مشاهده می گردد که در مورد تمام شاخص های رنگی اثر هم زمان روغن و نانوذله کیتوزان اثر کاهش داشته است که با افزایش میزان روغن این اثر مشهودتر شده است. اثر بارزتر نمونه هایی که حاوی روغن و نانوذله هستند بر شاخص های رنگی احتمالاً به وجود قطرات روغن در بافت پاستیل مربوط می شود. این قطرات روغن می توانند شفافیت نمونه ها را تغییر دهند. همچنین برهم کنش بین روغن و مولکول های آب شاخص انکساری ترکیبات هیدروکلوئیدی را تغییر می دهد که این می تواند باعث تغییر شاخص های رنگی شود [۱۸]. تمام نمونه ها در مقایسه با نمونه شاهد دارای اختلاف رنگ کلی ( $\Delta E$ ) معنی داری می باشند و وجود هم زمان نانوذله و روغن ماهی بر این ویژگی اثر بارزتری داشته است. لازم به ذکر است که اختلاف رنگ کمتر از ۳-۴ توسط چشم انسان قابل تشخیص نیست [۱۲]. همچنین مشاهده می شود که نمونه های حاوی ۲ و ۳ درصد روغن به همراه نانوذله کیتوزان اختلاف رنگ بالاتر از ۴ و در غلظت ۱ درصد کمتر از ۴ بوده است. این نتیجه نشان می دهد که استفاده از روغن ماهی به صورت پوشش داده شده در نانوذله کیتوزان تا ۱ درصد اثر منفی بر تغییر رنگ نخواهد داشت.

- [12] Benbettaieb, N., Kurek, M., Bornaz, S., & Debeaufort, F. 2014. Barrier, structural and mechanical properties of bovine gelatin–chitosan blend films related to biopolymer interactions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(12), 2409-2419.
- [13] Larkin, P. 2011. *Infrared and Raman spectroscopy: principles and spectral interpretation*. Elsevier.
- [14] Rao, K. S. V. K., Reddy, P. R., Lee, Y.-I., & Kim, C. 2012. Synthesis and characterization of chitosan–PEG–Ag nanocomposites for antimicrobial application. *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 920–925.
- [15] Wang, X. H., Li, D. P., Wang, W. J., Feng, Q. L., Cui, F. Z., Xu, Y. X., van der Werf, M. 2003. Crosslinked collagen/chitosan matrix for artificial livers. *Biomaterials*, 24(19), 3213–3220.
- [16] Wang, L.-J., Hu, Y.-Q., Yin, S.-W., Yang, X.-Q., Lai, F.-R., & Wang, S.-Q. 2015. Fabrication and characterization of antioxidant pickering emulsions stabilized by zein/chitosan complex particles (ZCPs). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(9), 2514–2524.
- [17] Wongkongkatep, P., Manopwisedjaroen, K., Tiposoth, P., Archakunakorn, S., Pongtharangkul, T., Suphantharika, M., Wongkongkatep, J. 2012. Bacteria Interface Pickering Emulsions Stabilized by Self-assembled Bacteria–Chitosan Network. *Langmuir*, 28(13), 5729–5736.
- [18] Pereda, M., Amica, G., & Marcovich, N. E. 2012. Development and characterization of edible chitosan/olive oil emulsion films. *Carbohydrate polymers*, 87(2), 1318–1325.
- Surfaces B: Biointerfaces, 74(1), 1–16.
- [5] Kargar, M., Fayazmanesh, K., Alavi, M., Spyropoulos, F., & Norton, I. T. 2012. Investigation into the potential ability of Pickering emulsions (food-grade particles) to enhance the oxidative stability of oil-in-water emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 366(1), 209–215.
- [6] Kargar, M., Spyropoulos, F., & Norton, I. T. 2011. The effect of interfacial microstructure on the lipid oxidation stability of oil-in-water emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 357(2), 527–533.
- [7] Atarian, M., Rajaei, A., Tabatabaei, M., Mohsenifar, A., & Bodaghi, H. 2019. Formulation of Pickering sunflower oil-in-water emulsion stabilized by chitosan-stearic acid nanogel and studying its oxidative stability. *Carbohydrate polymers*, 210, 47-55.
- [8] Mwangi, W. W., Ho, K. W., Tey, B. T., & Chan, E. S. 2016. Effects of environmental factors on the physical stability of pickering-emulsions stabilized by chitosan particles. *Food Hydrocolloids*, 60, 543–550. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.04.023>
- [9] Xiao, J., Wang, X., Perez Gonzalez, A. J., & Huang, Q. 2016. Kafirin nanoparticles-stabilized Pickering emulsions: Microstructure and rheological behavior. *Food Hydrocolloids*, 54, 30–39.
- [10] Caine, W. R., Aalhus, J. L., Best, D. R., Dugan, M. E. R., & Jeremiah, L. E. 2003. Relationship of texture profile analysis and Warner-Bratzler shear force with sensory characteristics of beef rib steaks. *Meat science*, 64(4), 333-339.
- [11] Valenzuela, C., Abugoch, L., & Tapia, C. 2013. Quinoa protein–chitosan–sunflower oil edible film: Mechanical, barrier and structural properties. *LWT-Food Science and Technology*, 50(2), 531-537.

## Investigation of PhysicoMechanical Properties of Functional Gummy Candy Fortified with Encapsulated Fish Oil in Chitosan-Stearic Acid Nanogel by Pickering Emulsion Method

Mirzaee Moghaddam, H.<sup>1\*</sup>

1. Assistant Prof. in Department of Soil and Water, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology,

(Received: 2019/07/06 Accepted:2019/08/05)

However, the beneficial effects of fish oil, which is fortified in omega-3 fatty acids, is known. But its high sensitivity to oxidation and the formation of undesirable compounds has limited its use in food systems. Therefore, the purpose of this study was the encapsulation of fish oil in chitosan-stearic acid nanogel, by Pickering emulsion method and import it into a food system (Gummy candy) and investigation the physicochemical properties of the product. Initially, chitosan-stearic acid nanogel was created by self-assemble method and the results of FTIR confirmed the successful connection between chitosan and stearic acid. Also, SEM image showed that the nanoparticles formation was spherical nearly. In the next step, fish oil Pickering emulsions were prepared in different concentrations using chitosan-stearic acid nanogel and used in formulation of gummy candy and in continue, the texture profile analysis (TPA) and also the measurements of the color indexes of the samples were performed. The results of TPA showed that the existence of the nanogel, increased the Springiness (from% 88.5 to% 92.5) and adhesion (from Ns 0.33 to Ns 0.63) and reduced the hardness (from N 178.6 to N 125.8) of texture of gummy candy samples. On the other hand, the presence of fish oil reduced all of the texture indexes. About the color indexes, the nanogel decreased the  $L^*$  (from 58.13 to 56.46) and  $a^*$  (from -5.5 to -4.4) indexes. Also, the results showed that fish oil in combination with nanogels reduced the color indexes.

**Keywords:** Physicochemical Properties, Fish Oil, Gummy Candy, Chitosan-Stearic Acid Nanogel, Pickering emulsion.

---

\* Corresponding Author E-Mail Address: hosseinsg@yahoo.com