

مقاله علمی - پژوهشی

بهینه‌سازی تولید نانوامولسیون اسانس پونه کوهی ایرانی حاوی اسیدهای چرب امگا سه با استفاده از روش امولسیفیکاسیون خودبه‌خودی

نسرین فرجی^۱ - محمد علیزاده^{۲*} - هادی الماسی^۳ - سجاد پیرسا^۴ - سهیلا فرجی^۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۹/۲۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۱/۳۰

چکیده

اخیرا استفاده از روش‌های کم انرژی به دلیل عدم نیاز به تجهیزات گران قیمت و سهولت تولید بسیار رواج یافته است. در این پژوهش، نانوامولسیون اسیدهای چرب امگا سه با استفاده از اسانس پونه کوهی ایرانی به روش امولسیفیکاسیون خودبه‌خودی تهیه گردید. هدف از این مطالعه، بررسی شرایط بهینه تولید نانوامولسیون با استفاده از طرح دی اپتیمال بود، برای این منظور نانوامولسیون‌های حاوی اسیدهای چرب امگا سه با استفاده از اسانس گیاهی پونه کوهی ایرانی با چهار متغیر مستقل غلظت امگا سه (۷۵-۲۵ درصد)، نوع سورفاکتانت (توئین ۸۰، توئین ۲۰، توئین ۸۰:۲۰ و کازئینات سدیم)، نسبت سورفاکتانت به روغن (۳۰۰-۱۰ درصد) و مدت زمان نگهداری (۶۰-۱ روز) تولید گردیدند و تاثیر آنها بر پارامترهایی مانند میانگین قطر ذرات، توزیع اندازه ذرات، شاخص کدورت، اندیس خامه‌ای شدن، خواص آنتی‌اکسیدانی، اندیس پراکسید، اندیس تیوباریتوریک اسید، ضریب شکست، بریکس و pH مورد مطالعه قرار گرفت و سپس به‌منظور تعیین بهترین فرمولاسیون بهینه‌سازی انجام گرفت. نتایج نشان دادند که میانگین اندازه قطرات بسیار تحت تاثیر غلظت سورفاکتانت و نوع سورفاکتانت بود و با افزایش مقدار سورفاکتانت، میانگین قطر قطرات کاهش معنی‌داری یافت، در واقع افزایش غلظت سورفاکتانت در نانوامولسیون‌ها در اکثر موارد سبب افزایش میزان جذب سورفاکتانت به سطح W/O گردیده و در نتیجه منجر به کاهش بیشتر کشش سطحی شد و در نهایت سبب کاهش اندازه ذرات و کاهش اندیس خامه‌ای شدن گردید، همچنین افزایش غلظت سورفاکتانت، به علت کاهش میانگین قطر ذرات، پراکنش نوری کاهش یافته و میزان کدورت کاهش یافت، از طرفی افزایش غلظت سورفاکتانت و کاهش اندازه ذرات، در کاهش اندیس پراکسید نیز موثر بود. با استفاده از بهینه‌سازی عددی مقادیر بهینه متغیرهای مستقل نانوامولسیون‌های پونه کوهی ایرانی حامل اسیدهای چرب امگا سه به ترتیب، میزان امگا سه ۲۹/۳۱ درصد، مدت زمان نگهداری ۴۰ روز، درصد SOR (۱۰۰) درصد و نوع سورفاکتانت توئین ۸۰:۲۰ تعیین شدند.

واژه‌های کلیدی: نانوامولسیون، اسیدهای چرب غیراشباع، امگا سه، امولسیفیکاسیون خودبه‌خودی، اسانس پونه کوهی ایرانی

مقدمه

داروسازی تشکیل شده و به‌طور کلی به اجزایی از ماده غذایی گفته می‌شود که علاوه برداشتن خواص تغذیه‌ای پایه، دارای فعالیت بیولوژیکی ارزشمند و سلامتی‌بخش هستند و باعث پیشگیری و یا درمان بیماری‌ها می‌شوند (Saarela et al., 2002). افزایش دانش عمومی در مورد اهمیت رژیم سالم، پیشرفت‌های فنی و تکنولوژیکی در صنایع غذایی، افزایش تقاضا برای مواد غذایی سلامتی‌بخش از طرف مصرف‌کنندگان و پیش‌بینی‌ها برای پیری جمعیت و افزایش هزینه‌های مراقبت‌های بهداشتی علاقه به غذاهای فراسودمند را دو چندان نموده است. مهمترین محصولات فراسودمند عبارتند از غذاهای حاوی: اسیدهای چرب ضروری، ویتامین‌ها، کاروتنوئیدها، آنتوسیانین‌ها، فلاونوئیدها و استرول‌ها. اسیدهای چرب امگاسه، دسته‌ای از اسیدهای چرب چندغیراشباع (معمولاً بیش از دو پیوند دوگانه) می‌باشند که پیش‌ساز بسیاری از ترکیبات ضروری

استراتژی تولید غذا تنها اطمینان از دریافت غذای کافی برای آحاد جامعه نمی‌باشد، بلکه اطمینان از مصرف غذای کافی همراه با کیفیت خوب و ایمنی بالا، سبب دستیابی به یک رژیم غذایی متعادل و سلامت‌بخش خواهد گردید. از طرفی به تازگی بیشتر مردم دارای نگرانی در خصوص رژیم غذایی خود از نظر سلامت آن می‌باشند. مواد غذا- دارو از ترکیب دو واژه تغذیه و

۱- دکترای علوم و صنایع غذایی، مدیر تحقیق و توسعه شرکت آذین شوستر، خوزستان، شوستر، صنایع غذایی مجید.

۲ و ۳- به ترتیب استاد و دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه ارومیه، ایران.

۴- کارشناس ارشد صنایع غذایی، مدیر کنترل کیفیت شرکت آذین شوستر،

خوزستان، شوستر، صنایع غذایی مجید.

*- نویسنده مسئول: (Email: Nasrin.faraji88@yahoo.com)

DOI: 10.22067/ifstrj.v17i2.84721

ذرات نانومولسیون بسیار کمتر از طول موج نور است لذا نور را شدید پخش نکرده در نتیجه شفاف و یا تا حدودی کدر هستند (Walker et al., 2015a). نانومولسیون‌ها کاربردهای عملی بسیاری در ساخت مواد شیمیایی، صنایع غذایی، دارویی و آرایشی و بهداشتی دارند (Saber et al., 2013b). یکی از مهمترین کاربردهای نانومولسیون‌های خوراکی در صنایع غذایی و دارویی برای درون‌پوشانی ترکیبات لیپوفیل مانند اسیدهای چرب ضروری، ویتامین‌های محلول در چربی، مواد عطر و طعمی، رنگ‌ها، مواد نگهدارنده‌ها و داروها هستند. نانومولسیون‌ها به دو روش پر انرژی (توسط ابزارهای مکانیکی) و کم انرژی تهیه می‌شوند. روش‌های کم انرژی به‌طور کل وابسته به پدیده‌های بین سطحی در مرز بین فازهای آب- روغن هستند و این روش در تولید ذرات کوچک‌تر کاربرد فراوانی دارد (McClements, 2015). تنها محدودیت این روش‌ها نوع روغن، نوع و غلظت امولسیفایر مورد استفاده است. به‌طوریکه باید از غلظت‌های نسبتاً بالایی از امولسیفایرهای سنتزی ریزمولکول استفاده شود که این امر استفاده از این روش‌ها را در بسیاری از مصارف غذایی محدود می‌کند (Rao, 2012). تولید خودبه‌خودی امولسیون یکی از روش‌های کم انرژی تولید نانومولسیون است که در نتیجه تیتراسیون یک فاز آلی حاوی روغن، سورفاکتانت هیدروفیل و حلال قابل امتزاج با آب در فاز آبی رخ می‌دهد. ویژگی‌های خودبه‌خودی این روش نتیجه حالت‌های غیرتعادلی اولیه دو فاز مختلف است که بدون هم‌زدن در تماس با هم قرار می‌گیرند (Saber et al., 2013). تشکیل نانومولسیون توسط امولسیفیکاسیون خودبه‌خودی به دو مکانیزم آشفتنگی سطحی در اثر مهاجرت سورفاکتانت به فاز آبی که در آن بیشتر حل می‌شود و انتشار و رشته‌ای شدن در اثر کشاندن مولکول‌های روغن چسبیده به سورفاکتانت به داخل فاز آبی نسبت داده می‌شود (Saber et al., 2013b). زمانی که دو فاز روغن و آب در مجاورت هم قرار می‌گیرند (تیترا شدن فاز روغن حاوی امولسیفایر درون فاز آبی) امولسیفایر موجود در فاز روغنی به فاز آبی که حلالیتش در آن بیشتر است، مهاجرت می‌کند و در نتیجه آشفتنگی بین سطحی ایجاد شده و هنگام اضافه کردن امولسیفایر به فاز آبی، مقداری روغن نیز همراه آن وارد فاز آبی می‌شود. این روغن متصل به سورفاکتانت در داخل آب به‌صورت قطرات ریزامولسیون، رشته‌ای می‌شود و سبب تولید خودبه‌خودی قطرات ریز می‌شود. توئین‌ها (توئین ۸۰ یا پلی‌اکسی اتیلن سوربیتان منوآلئات و توئین ۲۰ یا پلی‌اکسی اتیلن سوربیتان منو لورات) از دسته سورفاکتانت‌های غیر یونی بوده که به‌طور گسترده‌ای در صنعت غذا استفاده می‌شود زیرا سمیت کمی دارند. پروتئین کازئینات سدیم از دسته سورفاکتانت‌های بیوپلیمری بزرگ مولکولی می‌باشند. این مولکول‌ها ساختار تصادفی و انعطاف‌پذیری دارند و ساختار دوم بسیار محدودی دارند و دارای مناطق آبگریز و آبدوست در زنجیره پپتیدی

در بدن هستند، اسیدهای چرب غیراشباع دوکوزاهگزانوئیک اسید، ایکوزاپنتانوئیک اسید و آلفالینولنیک اسید مهم‌ترین اسیدهای چرب امگا سه محسوب می‌شوند (Maki et al., 2014). اسیدهای چرب امگا سه نقش مهمی در پیشگیری از بیماری‌های قلبی- عروقی به‌خصوص در جمعیت‌های در معرض خطر دارند (Kris-Etherton et al., 2009). فواید فراوان اسیدهای EPA و DHA در امگا سه تنها محدود به سیستم عروقی نمی‌شود و کمبود این ماده مغذی می‌تواند سبب ایجاد مشکلات جدی شود. به‌طوری که برای عملکرد صحیح سایر قسمت‌های بدن ضروری هستند، به‌عنوان مثال سبب رشد و نمو، سلامت بافت‌های چشمی، مغزی و بهبود بیماری‌های التهابی مثل آرتروز می‌گردد (Lavie et al., 2009). منابع غذایی امگا سه عبارتند از: روغن ماهی، روغن کریل، روغن تخم ماهی، روغن جلبک، روغن بذرتان، روغن دانه چیا، روغن ساوا اینچی، روغن اچپوم و روغن گیاه شاهدانه. میزان این اسیدهای چرب ضروری امگا سه در موجودات دریایی مانند ماهی‌ها بیشتر از سایر مواد غذایی هست، اما استفاده از ماهی به‌عنوان منبع غنی از اسیدهای چرب غیراشباع به دلیل قیمت بالای آنها، بوی نامطبوع و میزان آلودگی‌هایی مانند فلزات سنگین، قابلیت دسترسی و تامین همیشگی آنها محدودیت‌هایی دارد (Freemantle Kesavulu et al., 2002; Lavie et al., 2009 et al., 2006). یکی از راهکارهای مناسب برای جلوگیری از بروز این مشکلات، غنی‌سازی مواد غذایی با اسیدهای چرب امگا سه است، اما محدودیت‌هایی در ارتباط با غنی‌سازی مواد غذایی با روغن ماهی وجود دارد اولاً: اسیدهای چرب غیراشباع مولکول‌های بسیار آبگریزی بوده که محلولیت در آب بسیار پایینی دارند و ثانياً اسیدهای چرب غیراشباع بسیار حساس نسبت به اکسیداسیون هستند و در طی دوران نگهداری دچار فساد شده و تولید ترکیبات نامطبوعی می‌کنند که مصرف را برای مصرف‌کننده با مشکل مواجه می‌کند (Nuchi et al., 2001). مطالعات پیشین نشان داده‌اند که سیستم‌های تحویلی کلونیدی مانند امولسیون‌ها، امولسیون‌های چندلایه، امولسیون‌های چندگانه و نانومولسیون‌ها می‌توانند اسیدهای چرب غیراشباع را درون شرایط آبی قرار داده و پایداری اکسیداسیونی آنها را بهبود دهند. استفاده از نانوحامل‌ها برای انتقال و حفاظت از مواد مغذی محلول در چربی یا به عبارت دیگر انکپسوله کردن این ترکیبات، راهکاری مناسب است (McClements et al., 2007). سیستم‌های امولسیونی مورد استفاده برای انتقال ترکیبات نیز خود به دو دسته اصلی ماکرو امولسیون معمولی (اندازه ذرات بیشتر از ۱۰۰ نانومتر) و نانومولسیون (اندازه ذرات حدوداً ۵۰۰-۱۰ نانومتر) تقسیم می‌گردند (Rao and McClements, 2012). به‌دلیل اینکه اندازه

- 1 DHA
- 2 EPA
- 3 ALA

دارند (Méx, 2008). اسانس‌های گیاهی، مایعات روغنی معطر هستند که از بخش‌های مختلف گیاهان به دست آمده و به عنوان طعم‌دهنده‌های غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Li et al., 2015).

مطالعات مختلفی ویژگی‌های ضد میکروبی، ضد قارچی، ضد ویروسی، ضد انگلی و آنتی‌اکسیدانی اسانس‌های گیاهی را تایید نمودند. اسانس‌های ضروری برای غلبه بر مشکلات ناشی از اکسیداسیون و ناپایداری فیزیکی می‌توانند به کار گرفته شوند. علاوه بر این، اسانس‌ها در محصولات ایجاد بو و مزه مطلوبی می‌کنند زیرا آنها می‌توانند عطر و طعم‌های نامطلوب مانند روغن ماهی را پوشانده و محصولات غنی شده با روغن ماهی بسیار مطلوب‌تر برای مصرف‌کننده، تولید نمایند. پونه کوهی ایرانی گیاهی معطر از خانواده نعناعیان است، پونه کوهی منبع خوبی از ویتامین K، ویتامین E، منیزیم، منگنز، آهن، کلسیم، اسیدهای چرب امگا سه و امگا شش می‌باشد. این ترکیب به طور عمده از مونوترپن‌های اکسیژنه نظیر منتون، پولگون و پیریتون تشکیل شده‌اند و ترکیبات مونوترپن هیدروکربنی مانند لیمونین در مقادیر مختلف در روغن این گیاه نیز یافت می‌شوند (Al-Bayati, 2009). هدف این پژوهش، بررسی شرایط بهینه تولید نانوامولسیون امگا سه با استفاده از اسانس پونه کوهی ایرانی به عنوان فاز روغنی همراه امگا سه به روش امولسیفیکاسیون خودبه‌خودی و ارزیابی خصوصیات فیزیکوشیمیایی آنها می‌باشد.

ترکیبات موجود در اسانس پونه کوهی ایرانی

ترکیبات موجود در اسانس گیاهی پونه کوهی با دستگاه گاز کروماتوگرافی - طیف سنجی جرمی (Agilent 6890، آمریکا) به صورت کمی اندازه‌گیری شد. این دستگاه با ستون موئینه به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میکرومتر و ضخامت لایه داخلی ۰/۲۵ میکرومتر با برنامه دمایی ۵۰ تا ۲۶۵ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۵ درجه سانتی‌گراد در دقیقه و نگهداری ستون در ۲۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد، دمای اتاق تزریق ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد بود و از گاز هلیوم با سرعت جریان ۱/۵ میلی‌متر بر دقیقه استفاده شد. طیف نگار جرمی مورد استفاده (Agilent 5973) با انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و دمای منبع یونیزاسیون ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد بود. شناسایی اجزا با مقایسه طیف جرمی آنها با طیف ترکیبات در حافظه کامپیوتر و استانداردهای معتبر صورت گرفت (Faraji et al., 2018).

اندازه ذرات و توزیع اندازه ذرات

توزیع اندازه ذرات و قطر متوسط آنها در دستگاه آنالیز کننده ذرات DLS (Shimadzu، ژاپن) با محدوده ۵۰ نانومتر تا ۵۰ میکرومتر تعیین گردید. این دستگاه بر اساس پراکنش نور لیزر عمل می‌کند. اندازه‌گیری ذرات پس از گذشت ۲۴ ساعت از تولید و نگهداری نمونه‌ها در دمای محیط (۲۵ درجه سانتی‌گراد) انجام شد. متوسط اندازه ذرات بر اساس قطر میانگین حجمی تعیین شد و کلیه نمونه‌ها در سه تکرار اندازه‌گیری شدند (Saberi et al., 2013). میانگین قطر حجمی (میانگین حجم معادل) مطابق معادله (۱) تعیین شد:

$$D[4.3] = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3} \quad (1)$$

n_i : تعداد ذرات

d_i : میانگین قطر ذرات

توزیع اندازه ذرات نیز با استفاده از معادله (۲) محاسبه شد:

$$\text{Span} = (D_{90\%} - D_{10\%}) / D_{50\%} \quad (2)$$

از آن، ۹۰ درصد، ۵۰ درصد و ۱۰ درصد حجم کل ذرات موجود در سیستم را به ترتیب تشکیل می‌دهند.

مواد و روش‌ها

روغن ماهی از شرکت داروسازی زهراوی تبریز، کازئینات سدیم، DPPH، متانل از شرکت مرک آلمان (Merck Chemical, Germany)، توئین ۸۰، توئین ۲۰، هیدروکسید سدیم، فنل فتالین، تری کلرو استیک اسید، کلروفرم، چسب نشاسته از شرکت سیگما آلدريج آمریکا (Sigma Aldrich, USA) خریداری شد. اسانس پونه کوهی ایرانی از شرکت دانش بنیان عطر و طعم ماگنولیا (ایران) خریداری شد. آب دوار تقطیر برای تمام نمونه‌ها تهیه شد. سایر مواد شیمیایی مورد استفاده با درجه آزمایشگاهی تهیه شدند.

تهیه نانوامولسیون

سیستم نانوامولسیون حاوی امگا سه با استفاده از روش کم انرژی تشکیل خودبه‌خودی امولسیون روغن در آب با اضافه کردن قطره قطره فاز روغنی (محلول امگا سه در اسانس روغنی حامل به همراه سورفاکتانت‌های توئین ۲۰، توئین ۸۰ و کازئینات سدیم) مطابق طرح آماری (جدول ۱) بر روی آب دیونیزه به نسبت ۲۰ به ۸۰، تولید شد، درحین تشکیل، امولسیون به‌طور مداوم توسط همزن مغناطیسی با سرعت بهینه ۸۰۰ دور بر دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸ ساعت همزده شد. با توجه به تأثیر دما در اندازه ذرات نانوامولسیون، از همزن مغناطیسی مجهز به سنسور تنظیم دما (MS-11C)

کدورت

کدورت نانوامولسیون‌های تهیه شده با دستگاه اسپکتروفوتومتر UV-VIS (UV-1700 Pharma Spec, Shimadzu Corporation) در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Xu, 2005).

اندیس خامه‌ای شدن

۱۰ میلی‌لیتر از نمونه تولید شده به یک لوله آزمایش انتقال داده شد و درب آن محکم بسته شد و در طی دوران نگهداری دو فاز شدن نمونه را به دو لایه یک لایه رویی (کرم) و لایه زیری (سرم) مشاهده شد. حجم و ارتفاع نمونه‌ها در طول دوران نگهداری اندازه‌گیری گردید (Chanda et al., 2011).

$$\text{Creaming Index (\%)} = (V_t - V_s) / V_t \quad (5)$$

V_t حجم کل نمونه و V_s حجم سرم می‌باشد.

قدرت آنتی‌اکسیدانی

از پودر DPPH محلول ۰/۱ میلی‌مولار با متانول تهیه شد (۰/۰۰۴ گرم از DPPH در ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول)، ابتدا دو میلی‌لیتر محلول در هر لوله آزمایش ریخته شد، سپس ۱۰۰ میکرولیتر نمونه اضافه گردید و پس از همزدن به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه و تاریکی نگهداری شد. میزان جذب نوری به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر با سه تکرار اندازه‌گیری شد. محلول DPPH بنفش رنگ پس از اضافه شدن نمونه به آن بر اساس میزان قدرت آنتی‌اکسیدانی تا رنگ زرد تغییر کرد (Molyneux, 2004).

درصد مهار اکسیداسیون هر نمونه از معادله (۶) محاسبه شد:

$$AI (\%) = (A - A_0) / A_0 \quad (6)$$

AI: درصد مهار DPPH

A: جذب نمونه‌ها

A_0 : جذب محلول کنترل که در آن هیچ ترکیب مورد آزمایش وجود ندارد.

pH

اندازه‌گیری pH در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با pH متر دیجیتال (Martín-Diana et al., 2009) با ۳ بار تکرار انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

در این تحقیق از طرح دی‌اِپتیمال^۱ با بررسی تاثیر چهار فاکتور مستقل شامل میزان امگا سه، زمان نگهداری، نسبت سورفاکتانت به فاز روغنی^۲ و نوع سورفاکتانت به منظور بررسی خواص فیزیکوشیمیایی و پایداری فرمولاسیون نانوامولسیون‌های اسانس پونه کوهی ایرانی حاوی اسیدهای چرب امگا سه مطابق جدول ۱ به تعداد ۳۲

اندیس پراکسید

برای اندازه‌گیری اندیس پراکسید ۵ گرم نمونه در ۳۰ میلی‌لیتر محلول اسید استیک-کلروفرم (نسبت ۳ به ۲) با افزودن ۰/۵ میلی‌لیتر محلول اشباع یدید پتاسیم مخلوط گردیده و پس از گذشت زمان ۱ دقیقه، با افزودن ۳۰ میلی‌لیتر آب و در حضور شناساگر نشاسته با محلول سدیم تیوسولفات ۰/۰۱ نرمال تیترا شدند (استاندارد ملی ایران، ۱۳۹۹).

$$PV = (N \times V \times 1000) / M \quad (3)$$

N = نرمالیت تیوسولفات سدیم

V = حجم مصرفی تیوسولفات سدیم

M = جرم نمونه

اندیس اسید تیوباربتوریک

اندازه‌گیری این شاخص مطابق با استاندارد ملی شماره ۱۰۴۹۴ انجام گرفت. به این ترتیب که ۲۰۰ میلی‌گرم نمونه با حلال بوتانول به حجم رسانده شد. ۵ میلی‌لیتر از مخلوط روغن-بوتانول مربوط به هر تیمار، به لوله‌های آزمایش خشک انتقال داده شد و ۵ میلی‌لیتر محلول وانکشر تیوباربتوریک اسید (۲٪) به آن‌ها اضافه گردید. سپس همه لوله‌های آزمایش در حمام آب ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت قرار گرفتند. بعد از سپری شدن زمان مربوطه و سرد شدن، جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۳۰ نانومتر خوانده شد و توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر نتایج از طریق فرمول زیر محاسبه گردید.

$$TBA = 50(A - B) / M \quad (4)$$

در این رابطه A میزان جذب نمونه، B میزان جذب نمونه شاهد و M وزن نمونه برحسب میلی‌گرم می‌باشد.

ضریب شکست و بریکس

ضریب شکست و بریکس نمونه‌ها ۲۴ ساعت بعد از تولید نمونه‌ها و همچنین در طی دوران نگهداری مطابق طرح آزمایشی با استفاده از دستگاه رفرکتومتر رومیزی (RX7000a; Atago, Japan) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در سه تکرار اندازه‌گیری شد (Martín-Diana et al., 2009).

1 D-optimal

2 SOR

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i x_i + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} x_{ii}^2 \quad (7)$$

در این مدل Y پاسخ پیش‌بینی شده، X_i و X_j متغیرهای مستقل (چهار فاکتور) و β_0 ضریب ثابت، β_i اثرات خطی، β_{ij} اثرات متقابل و β_{ii} اثرات مربعی می‌باشند. کل مدل شامل جملات خطی، درجه دوم و حاصل ضربها می‌باشد. برای نشان دادن رابطه هر یک از متغیرهای تابع در مدل رگرسیون با متغیرهای مستقل نمودارهای سطوح پاسخ و کانتورپلات ترسیم شدند، به منظور ارزیابی صحت مدل‌های برازش داده شده با داده‌های آزمایشی در شرایط بهینه تعیین شده، آزمون‌های مورد نظر صورت گرفته و نتایج ارزیابی کمی و کیفی آن با مقادیر پیشگویی شده توسط مدل مقایسه گردید.

فرمولاسیون استفاده گردید و پس از آنالیز رگرسیون و یا تعیین مدل‌های مناسب از روش تابع مطلوبیت عددی برای یافتن شرایط بهینه استفاده شد. سطح خطای نوع اول در این مطالعه برابر ۰/۰۵ در نظر گرفت شد. از نرم‌افزار Design Expert 7.1.6 جهت طراحی آزمایشی، تحلیل داده‌ها، مدل‌سازی، بهینه کردن پارامترها و رسم نمودارهای مربوط به روش سطح پاسخ استفاده گردید. هر یک از متغیرهای تابع میانگین قطر ذرات، شاخص کدورت، شاخص اسپن، اندیس خامه‌ای شدن، اندیس پراکسید، اندیس تیوباریتوریک اسید، خواص آنتی‌اکسیدانی، pH، ضریب شکست و بریکس در قالب مدل رگرسیون درجه دوم چند متغیره (معادله ۷) به صورت تابعی از متغیرهای مستقل (A, B, C, D) ارائه شدند.

جدول ۱- طرح آماری تولید نانوامولسیون‌های اسانس‌های حاوی اسیدهای چرب امگا سه

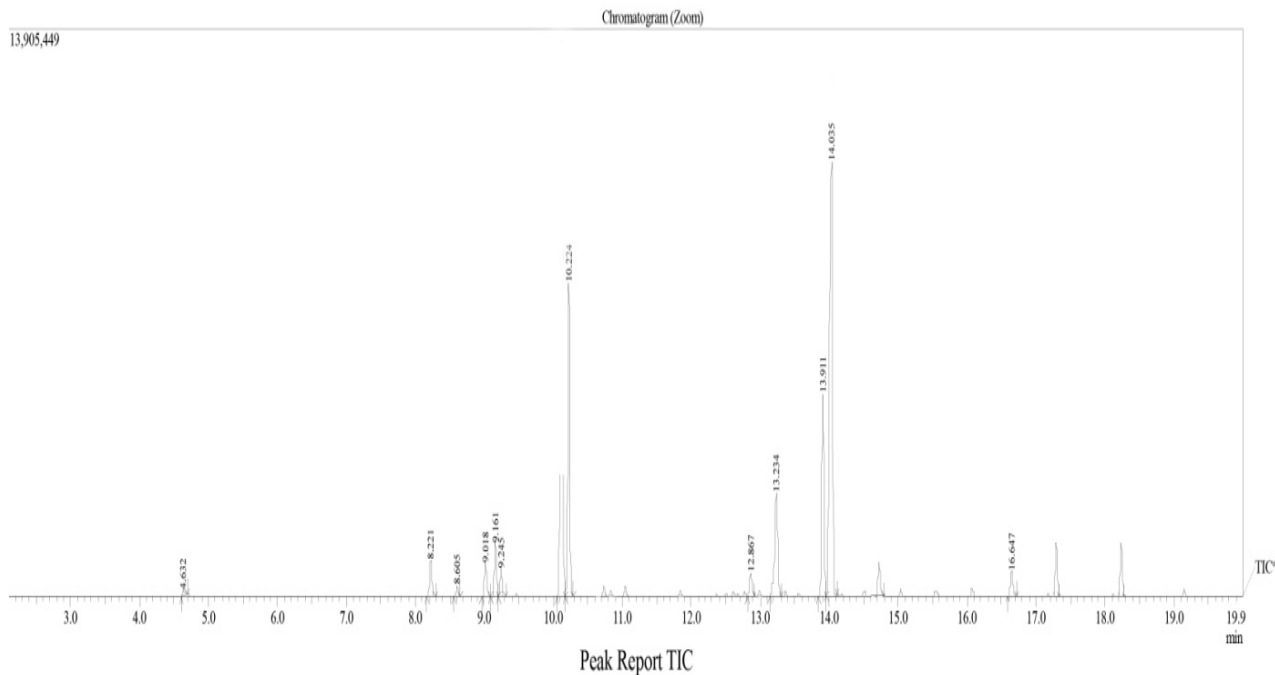
Run order	Block	Factors			
		A: Omega3(%)	B: Storage Time(day)	C: SOR (%)	D: Surfactant type
1	1	75	24.6	300	SC
2	1	52.75	9.26	91.4276	T80
3	1	50	38.17	155	T20
4	1	65	1	10	SC
5	1	50	38.17	155	T20
6	1	75	60	300	T80
7	1	25	60	276.8	T80:20
8	1	75	30.5	10	T80
9	1	25	60	10	T80
10	1	75	60	68	SC
11	1	25	1	10	T20
12	1	75	1	134.7	T80:20
13	1	52.75	9.26	91.4276	T80
14	1	25	1	10	T80
15	1	25	36.4	10	SC
16	1	75	1	300	T80
17	1	71.25	60	10	T80:20
18	1	25	30.5	300	T80
19	1	25	1	242	SC
20	1	25	1	10	T80:20
21	1	71.75	37.875	161.0556	T80:20
22	1	25	60	300	T20
23	1	43.60223	58.82	10	T20
24	1	25	1	10	T80:20
25	1	75	60	10	T20
26	1	50	38.17	155	T20
27	1	40.95159	1	174.0415	T20
28	1	75	1	300	T20
29	1	25	30.5	300	T80
30	1	47	1	300	T80:20
31	1	56.0709	54.1	300	T80:20
32	1	35.25	60	300	SC

نتایج و بحث

کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی اسانس پونه کوهی ایرانی
 بر اساس آنالیز اسانس پونه کوهی با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنج جرمی مطابق کروماتوگرام شکل ۱

عمده‌ترین ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس پونه کوهی شامل کارون (۲۵/۲۵٪)، پلارگون (۱۰/۴۲٪)، لیمونین (۹/۱۲٪)، اتوکالیپتول (۷/۶۰٪)، دی‌هیدروکاوئول (۷/۰۶٪)، منتون (۶/۷٪)، پیپریتون (۵/۸٪)، ۸-سینتول (۵/۴٪)، پیپریتون اکسید (۵/۲٪) و بتا پینین (۲/۷۱٪) و ترکیبات کم مقدار می‌باشند.

GCMS\950323\Penny 7414 magnolia - 1..10 MeOH - Split 10\Penny 7414 magnolia - 1..10 MeOH - Split 10.QGD



شکل ۱- آنالیز گاز کروماتوگرافی گازی- طیف‌سنج جرمی اسانس پونه کوهی ایرانی

یافته در توصیف تغییرات پاسخ به‌عنوان تابعی از متغیرهای مستقل بیشتر می‌باشد (Ghosh et al., 2014).

میانگین قطر ذرات نانوامولسیون‌های اسانس پونه کوهی حاوی اسیدهای چرب امگا سه

مطابق آنالیز واریانس، عدد F دارای سطح معنی‌دار بالا، $P < 0.001$ ، ضرائب تبیین و تبیین اصلاح شده به ترتیب ۰/۹۱۷ و ۰/۸۶۱ بودند. به‌منظور اطمینان از صحت مدل انتخاب شده مطابق آنالیز واریانس مربوطه شاخص عدم برازش معنی‌دار نبوده که بیانگر این است که مدل مناسب می‌باشد. بر اساس آنالیز واریانس اثرات خطی مدت زمان نگهداری، درصد SOR و نوع سورفاکتانت بر اندازه‌گیری قطر ذرات نانوامولسیون، اثرات درجه دوم مدت زمان نگهداری و اثرات متقابل مقدار امگا سه در مدت زمان نگهداری،

انتخاب مدل کارآمد به‌منظور پیشگویی پاسخ‌ها

روش سطح پاسخ از روش‌های پیشرفته برای تحلیل و مدل‌سازی داده‌ها است که دارای روش‌های گوناگونی برای طراحی آزمایشی می‌باشد. یکی از پرکاربردترین روش‌ها روش دی‌اپتیمال بوده است. در روش سطح پاسخ به ازای هر متغیر وابسته مدل رگرسیونی چندمتغیره‌ای تعریف می‌شود که تاثیر خطی، درجه دوم و متقابل متغیرهای مستقل را بر روی هر متغیر وابسته بیان می‌کند. مدل‌های به‌دست آمده از آنالیز داده‌های واقعی برای نانوامولسیون‌های پونه کوهی نوشته شده است. ضرائب مربوط به مدل‌های رگرسیونی و نتایج آنالیز واریانس برای هر یک از متغیرهای تابع استخراج گردید. برای بررسی صحت مدل‌ها از تست عدم برازش، ضرائب تبیین و تبیین اصلاح شده استفاده گردید. از نظر آماری مدلی مناسب است که تست عدم برازش آن معنی‌دار نبوده و دارای بالاترین مقادیر R^2 و $Adj R^2$ باشد. هر چه عدد R^2 به یک نزدیکتر باشد قدرت مدل برازش

1 Lack of fit

$$D_{43} = 94.26032 - 4.845803 A + 13.32244 B - 52.75502 C + 9.010530 D_1 - 31.40702 D_2 + 19.94970 D_3 - 36.76454 AB + 14.93053 AC + 56.18682 CD_1 - 3.77316 CD_2 - 40.36668 CD_3 + 49.90324 B^2$$

در معادله فوق ضرائب A، B، C، D به ترتیب نشانگر مقدار امگا سه (درصد)، مدت زمان نگهداری (روز)، درصد SOR و نوع سورفاکتانت می‌باشند.

مقدار امگا سه در درصد SOR و درصد سورفاکتانت معنی‌دار بودند و درصد SOR بیشترین تاثیر معنی‌داری بر میانگین قطر ذرات را نشان داد. آنالیز داده‌های آزمایش نشان داد که تغییرات میانگین قطر ذرات در نمونه‌های نانوامولسیون اسانس پونه کوهی ایرانی حاوی اسیدهای چرب امگا سه را می‌توان با معادله زیر توصیف کرد.

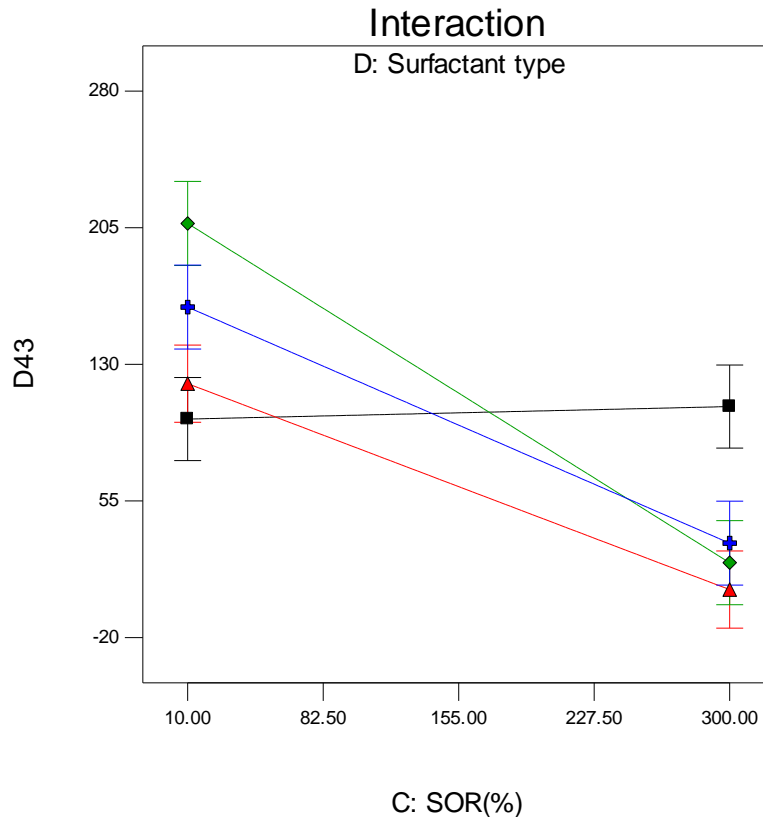
Design-Expert® Software

D43

- D1 SC
- ▲ D2 T80
- ◆ D3 T20
- D4 T80:20

X1 = C: SOR(%)
X2 = D: Surfactant type

Actual Factors
A: Omega 3(%) = 50.00
B: Storage Time(day) = 30.50



شکل ۲- نمودار برهمکنش تاثیر درصد SOR و نوع سورفاکتانت بر میانگین قطر ذرات

غلظت‌های بالاتر سورفاکتانت، تعداد بیشتری از ریزمولکول‌ها به صورت کاملاً متراکم در سطح بینابینی نسبت به پروتئین‌ها در کنار هم قرار گرفته و کشش سطحی را بیشتر کاهش می‌دهد که منجر به تولید ذرات ریزتر می‌گردد. اما در این نمودار مشاهده می‌گردد که نمونه‌ها در حضور سورفاکتانت کازئینات سدیم میانگین قطر ذرات کمتری داشتند که می‌توان بدین دلیل باشد که با توجه به ساختار منحصر به فرد این پروتئین و داشتن اسیدهای آمینه مختلف، موقعیت‌های بیشتری در مقایسه با سورفاکتانت‌های ریز مولکولی برای برقراری پیوند با اسانس داشته است و همچنین معنی‌دار نبودن تغییرات میانگین قطر ذرات در حضور سورفاکتانت پروتئینی نشانگر

شکل ۲ نمودار برهمکنش تاثیر درصد SOR و نوع سورفاکتانت در مقادیر ثابت میانی دو پارامتر دیگر بر میانگین قطر ذرات نانوامولسیون اسانس پونه کوهی ایرانی حاوی اسیدهای چرب امگا سه را نشان می‌دهد، در تمامی فرمولاسیون‌ها با افزایش درصد SOR کاهش قابل توجهی در میانگین اندازه ذرات مشاهده گردید. کمترین میانگین قطر ذرات مربوط به فرمولاسیون‌های حاوی سورفاکتانت توئین ۸۰ بود. با افزایش درصد SOR در فرمولاسیون‌های حاوی سورفاکتانت کازئینات سدیم، میانگین قطر ذرات تغییرات چندانی معنی‌دار نداشت. سورفاکتانت‌های کوچک مولکولی نسبت به سورفاکتانت‌های درشت مولکولی فعالیت سطحی بالاتری داشتند و در

نیز افزایش داشت که تا حدودی می‌تواند سبب افزایش اندازه ذرات نیز شود.

عملکرد بهتر این سورفاکتانت بوده که با مقدار کمتری از پروتئین، اندازه ذرات کوچکتری به دست آمد، از طرفی ضخامت نسبی لایه سورفاکتانت کازئینات سدیم نسبت به سورفاکتانت‌های ریز مولکولی

Design-Expert® Software

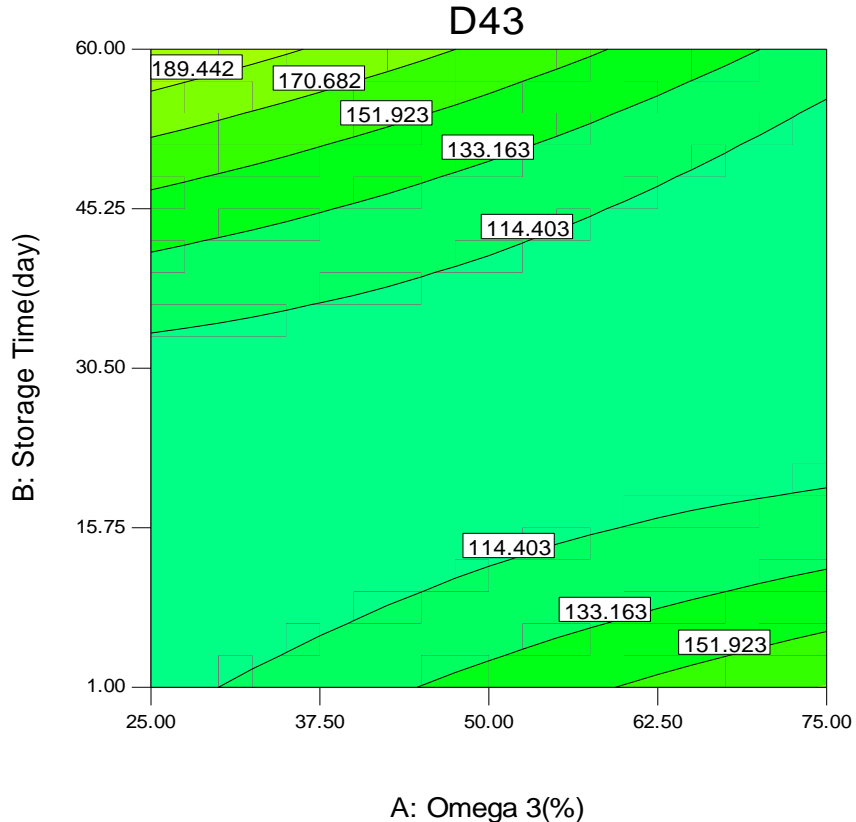
D43



X1 = A: Omega 3(%)
X2 = B: Storage Time(day)

Actual Factors

C: SOR(%) = 155.00
D: Surfactant type = SC



شکل ۳- نمودار دو بعدی تاثیر مقدار امگا سه و مدت زمان نگهداری بر میانگین قطر ذرات

Saberi و همکاران (۲۰۱۳) گزارش نمودند که کمترین ویسکوزیته و کشش سطحی مربوط به اسانس‌های روغنی، MCT (تری گلیسریدهای دارای زنجیره متوسط) و سپس روغن ماهی می‌باشد و افزایش در اندازه ذرات در نانوامولسیون‌های حاوی روغن ماهی به تنهایی در مقایسه با نانوامولسیون مخلوط روغن ماهی/ اسانس لیمو مشاهده شد. افزایش در مقدار امگا سه به معنای افزایش در ترکیبات با وزن مولکولی بالاتر مانند تری گلیسریدهای موجود در روغن ماهی در مقایسه با ترکیبات با وزن مولکولی کمتر اسانس بود، بنابراین سورفاکتانت‌ها از توانایی کافی جهت پوشش کامل سطح ترکیبات با وزن مولکولی بالاتر برخوردار نیستند. در غلظت‌های بالای روغن، امولسیفایر کافی برای پوشاندن ذرات تازه شکل گرفته وجود ندارد. در نتیجه ذرات جدید شکل گرفته، به یکدیگر پیوسته و ذرات بزرگتری را ایجاد می‌کنند. این نتایج با پژوهش Topuz و همکاران (۲۰۱۶) (۲۰۱۶) مطابقت داشت، Mahmoud Mostafa و همکاران (۲۰۱۵)

همانطور که در شکل ۳ مشاهده می‌گردد، در مقادیر کمتر امگا سه در حضور سورفاکتانت کازئینات سدیم با گذشت مدت زمان نگهداری، میانگین قطر ذرات افزایش یافت و همچنین افزایش همزمان مقدار امگا سه و مدت زمان نگهداری، میانگین قطر ذرات نیز افزایش داشت. در هر محدوده زمانی، تغییر در مقدار امگا سه میانگین قطر ذرات تغییر چندانی نداشتند، در طول مدت زمان نگهداری قطر ذرات ابتدا روند کاهشی و سپس افزایشی داشت و با توجه به نتایج آنالیز واریانس میزان امگا سه تاثیر معنی‌داری نداشته است و بیشترین تاثیر مربوط به مدت زمان نگهداری و درصد SOR بود. از طرف دیگر استفاده از اسانس‌های گیاهی در نانوامولسیون امگا سه به منظور پوشاندن عطر و طعم نامطلوب بوده اما به علت محلولیت آبی، امکان وقوع پدیده رسیدگی استوالد وجود داشت اما مخلوط کردن مقدار معینی از اسانس پونه کوهی با روغن ماهی به‌عنوان بازدارنده رسیدگی استوالد توانست این پدیده را به تعویق بیندازد. در تایید این نتایج

Balaraman (۲۰۱۵) گزارش کردند که اندازه ذرات نانوامولسیون کاتچین پایدار شده با سورفاکتانت لستین و توئین ها در طی مدت زمان نگهداری افزایش معنی‌داری داشتند. همچنین Ribeiro و همکاران (۲۰۱۵) بیان کردند که افزایش مقدار فاز روغن و مدت زمان فراصوت باعث افزایش میانگین اندازه ذرات گردید.

نیز افزایش اندازه ذرات با افزایش مقدار روغن موسیر را گزارش نمودند. Venkadesaperumal و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که با افزایش مقدار روغن در نانوامولسیون ویتامین ای-استات، میانگین قطر ذرات بیشتر گردید. Alzorqi و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند که در طی ۹۰ روز نگهداری، افزایش ناچیز در اندازه ذرات نانوامولسیون‌های بتاگلوکان مشاهده گردید. Gadkari و

Design-Expert® Software

D43

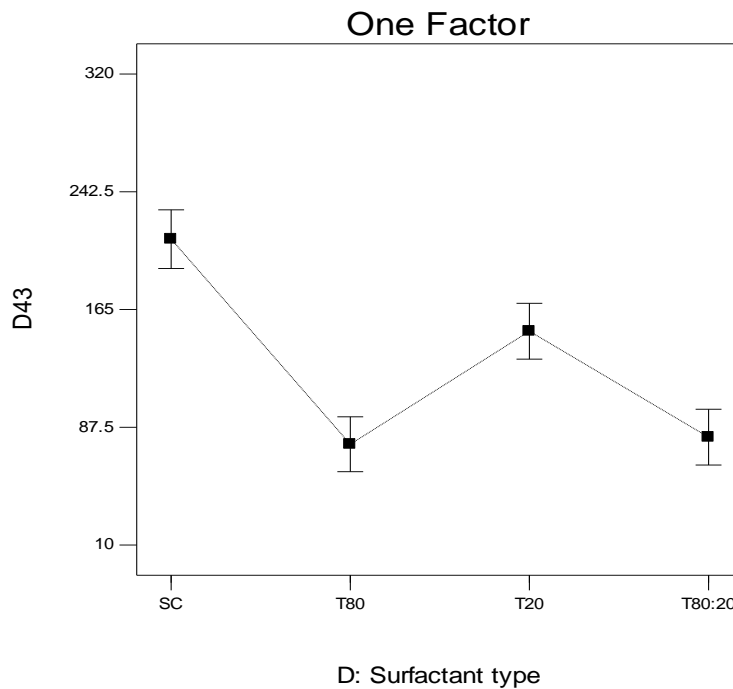
X1 = D: Surfactant type

Actual Factors

A: Omega 3(%) = 50.00

B: Storage Time(day) = 30.50

C: SOR(%) = 155.00



شکل ۴- نمودار تک فاکتور تاثیر نوع سورفاکتانت بر میانگین قطر ذرات در مقادیر ثابت میانی سه پارامتر ثابت مستقل

سورفاکتانت با پارامتر پکینگ بیشتر (چیده شدن کاملاً متراکم و کنار یکدیگر در سطح ذرات) نشان داده می‌شود که بیانگر مساحت عرضی گروه‌های دم هیدروفوب به گروه‌های سر هیدروفیل می‌باشد، عدد HLB یکی دیگر از پارامترهای تعیین‌کننده بر چگونگی فعالیت سورفاکتانت‌ها است، عدد HLB بالاتر نشان‌دهنده درجه هیدروفیلی بیشتر می‌باشد، در این مطالعه، با اینکه عدد HLB توئین ۲۰ (۱۶/۷) در مقایسه با توئین ۸۰ (۱۵) بیشتر بود، اما فرمولاسیون‌های حاوی سورفاکتانت توئین ۲۰ ذراتی با میانگین قطر بیشتری نسبت به سورفاکتانت توئین ۸۰ داشتند، بنابراین عدد HLB به تنهایی برای توجیه نتایج کفایت نمی‌کند که علت اصلی را می‌توان اینگونه توجیه نمود که، پارامتر پکینگ نسبت به عدد HLB شاخص کارآمدتری بوده و سورفاکتانت توئین ۸۰ در مقایسه با سورفاکتانت توئین ۲۰ پارامتر پکینگ بالاتری دارد زیرا، سورفاکتانت توئین ۸۰، مولکولی ۱۸ کرانه با باند غیراشباع می‌باشد و به‌صورت متراکم‌تر و کاملاً فشرده کنار هم‌دیگر قرار می‌گیرند و سطح بینابینی را به‌طور کامل پوشش

شکل ۴ نمودار تک فاکتور تاثیر نوع سورفاکتانت بر میانگین قطر ذرات در مقادیر میانی ثابت سه پارامتر میزان امگا سه، مدت زمان نگهداری و درصد SOR را نشان می‌دهد. بیشترین میانگین قطر ذرات مربوط به فرمولاسیون‌های حاوی سورفاکتانت کازئینات سدیم بود و کمترین میانگین اندازه ذرات مربوط به فرمولاسیون‌های حاوی سورفاکتانت‌های توئین ۸۰ و توئین ۲۰:۸۰ بوده است. انعطاف‌پذیری مولکول‌های سورفاکتانت، عدد HLB، تحرک و سرعت مهاجرت مولکول‌های سورفاکتانت به سطح، وزن مولکولی سورفاکتانت‌ها و نحوه چیدمان^۱ (پکینگ شدن، فشرده شدن) مولکول‌های سورفاکتانت جذب شده در لایه بین سطحی در کنار هم‌دیگر نیز موثر می‌باشد. سرعت جذب سورفاکتانت بر سطح ذرات، مهاجرت مولکول‌ها به لایه بین سطحی و اتصال به سطح بینابینی به مشخصات مولکولی سورفاکتانت مانند شکل هندسی بستگی دارد. شکل هندسی مولکول

¹ packing parameter

سورفاکتانت توئین ۲۰ را دارا بود. اگرچه نتایجی متضادی با نتایج این پژوهش توسط Cheong و همکاران (۲۰۱۰) بیان شد که نانومولسیون‌های حاوی سورفاکتانت توئین ۲۰ در مقایسه با سایر سورفاکتانت‌ها کمترین اندازه ذرات را داشته و نانومولسیون سورفاکتانت توئین ۸۰ بزرگترین اندازه ذرات را نشان داد که علت آن بالا بودن عدد HLB توئین ۲۰ بوده که باعث جذب سریعتر بر روی ذرات نانومولسیون تشکیل گردید.

توزیع اندازه ذرات نانومولسیون‌های اسانس پونه کوهی حاوی اسیدهای چرب امگا سه

آنالیز داده‌های آزمایش نشان داد که توزیع اندازه ذرات نانومولسیون اسانس پونه کوهی حاوی اسیدهای چرب امگا سه را می‌توان با معادله زیر توصیف کرد.

$$\text{SPAN} = 0.99 + 0.013 B + 0.000383 C - 0.029 D_1 + 0.000482 D_2 + 0.029 D_3 - 0.032 C^2 \quad (9)$$

در معادله فوق ضرایب A، B، C، D به ترتیب نشانگر مقدار امگا سه (درصد)، مدت زمان نگهداری (روز)، درصد سورفاکتانت می‌باشند. بر اساس جدول آنالیز واریانس توزیع اندازه ذرات، F-Value مدل نهایی ۷/۴۹۴۸۱، شاخص عدم برازش غیرمعنی‌دار و ضریب تبیین ۰/۸۵ و ضریب تبیین اصلاح شده ۰/۸۱۲ می‌باشد.

با افزایش مقدار سورفاکتانت توزیع اندازه ذرات (شاخص اسپن) تغییرات معنی‌داری نداشت (شکل ۵). ابتدا به میزان اندکی افزایش و سپس کاهش نشان داد. در حقیقت هر چه میزان اسپن کمتر باشد، پهنای منحنی توزیع ذرات کمتر و در نتیجه دامنه تغییرات قطر ذرات کمتر و اندازه ذرات به هم نزدیکتر گردیده و سیستم همگن‌تر خواهد بود. به عبارت دیگر با افزایش غلظت سورفاکتانت، سورفاکتانت‌های مازاد در محیط تشکیل میسلی می‌دهند که خود میسل‌ها در فاز پیوسته اندازه‌های متفاوت و غیریکسانی دارند که می‌تواند سبب افزایش شاخص اسپن شوند. در تحقیقات سایر دانشمندان که به بررسی این مسئله پرداخته‌اند نیز نتایج مشابهی دیده شده است. Walker و همکاران (۲۰۱۵) نتیجه گرفتند در غلظت‌های بالای سورفاکتانت (SOR بالای ۱/۷۵) توزیع اندازه ذرات تک مد و توزیع اندازه ذرات باریک بودند. همچنین در پژوهشی Meyer و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که با افزایش در غلظت سورفاکتانت، توزیع اندازه ذرات گسترده‌تر و بیومدال بود. Hu و همکاران (۲۰۰۳) نتیجه گرفتند که در طول مدت نگهداری، توزیع اندازه ذرات از توزیع تک مدی به دو توزیع دو مدی یا دوقله‌ای تغییر کرد. Esfanjani و همکاران (۲۰۱۷) نیز گزارش کردند که در طول مدت زمان نگهداری علیرغم افزایش اندازه ذرات عصاره زعفران در امولسیون آب در روغن، میزان توزیع اندازه ذرات باریک و تک مد بود و هیچگونه تغییری در

می‌دهند، بنابراین، نانومولسیون‌ها در حضور سورفاکتانت توئین ۸۰ اندازه ذرات کمتری داشتند. دلیل دیگر اینکه، همانطور که اشاره شد، سورفاکتانت توئین ۸۰ (پلی‌اکسی اتیلن سوربیتان منوولات) در ساختار زنجیره آبریزش دارای یک باند دوگانه اولئات بوده، در نتیجه تحرک بالاتری نسبت به سایر سورفاکتانت‌های با زنجیره اشباع مانند سورفاکتانت توئین ۲۰ و مولکول بیوپلیمری کازئینات سدیم دارد و بنابراین نسبت به سایر سورفاکتانت‌ها فعالیت سطحی بالاتری داشت و با کاهش بیشتر کشش سطحی منجر به تولید ذرات ریزتر گردید. در مورد مخلوط سورفاکتانت توئین ۸۰:۲۰ به علت وجود مقداری توئین ۸۰ و غیراشباعیت زنجیره نسبت به فرمولاسیون‌های حاوی سورفاکتانت تکی مانند سورفاکتانت توئین ۲۰ اندازه ذرات کوچکتر بودند. Saberi و همکاران (۲۰۱۳) پس از رد فرضیه اثر HLB روی اندازه قطرات، پارامتر کیپ شدن مربوط به هندسه مولکولی سورفاکتانت (سطح مقطع زنجیره آبریز (دم سورفاکتانت) نسبت به سطح مقطع سر آبدوست سورفاکتانت) را به‌عنوان عامل اصلی در تعیین عملکرد سیستم‌های کلوییدی بیان کردند. مساح و همکاران (۱۳۹۲) نیز سیستم مشابهی را با استفاده از توئین ۴۰ با HLB ۱۵/۶ که تقریباً نزدیک HLB توئین ۸۰ است تهیه کردند که اندازه قطرات تولید شده در این سیستم بالاتر از یک میکرومتر بوده است. به نظر می‌رسد اندازه قطرات به مقدار عددی HLB مربوط نمی‌شود و عوامل دیگری نیز وجود دارد. در تحقیقی مشابه، نیک‌نیا و همکاران (۱۳۹۲) با مقایسه دو نوع توئین ۸۰ و توئین ۲۰ طی تولید نانومولسیون حاوی ویتامین ای - استات بیان کردند، که اگرچه هیدروفیل بودن سورفاکتانت، لازمه تولید نانومولسیون روغن در آب است ولی با توجه به بالاتر بودن عدد HLB توئین ۲۰ نسبت به توئین ۸۰، اما قادر به تولید امولسیون در غلظت‌های پایین سورفاکتانت نیست، از طرف دیگر، پایین‌تر بودن وزن مولکولی سورفاکتانت‌های کوچک مولکولی (توئین‌ها، ۱۳۰۰ گرم بر مول) نسبت به وزن مولکولی بالاتر سورفاکتانت‌های پروتئینی (کازئینات سدیم ۲۳۰۰۰ دالتون) باعث می‌شود که توئین ۸۰ بتواند با سرعت بیشتری خود را به سطح قطرات کوچک روغن رسانده و مانع از بهم پیوستن و امتزاج آنها بعد از تشکیل گردد و به همین دلیل توانایی سورفاکتانت‌های ریزمولکولی مانند توئین‌ها نسبت به سورفاکتانت‌های بیوپلیمری در کیپ شدن، چیده شدن کاملاً متراکم کنار یکدیگر در سطح و پوشش‌دهی بهتر و کامل ذرات فاز روغنی (فاز پراکنده) موجب می‌شود که فعالیت سطحی بالاتر داشته باشد، در نتیجه افزایش قطر ذرات در نمونه‌های حاوی سورفاکتانت پروتئین کازئینات سدیم مشاهده گردید. این نتایج همچنین با پژوهش‌های Jafari و همکاران (۲۰۰۷)؛ Ghosh و همکاران (۲۰۱۴) و Silva و همکاران (۲۰۱۵) مطابقت داشت. Ghosh و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که سورفاکتانت توئین ۸۰ قدرت کاهش بیشتری در میانگین اندازه ذرات در مقایسه با

شاخص توزیع اندازه ذرات افزایش را نشان داد.

آن مشاهده نگردد. Zhang و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند که با افزایش نسبت روغن ماهی به پروتئین ایزوله سویا ۰/۶۷ تا ۱ میزان

Design-Expert® Software

Span

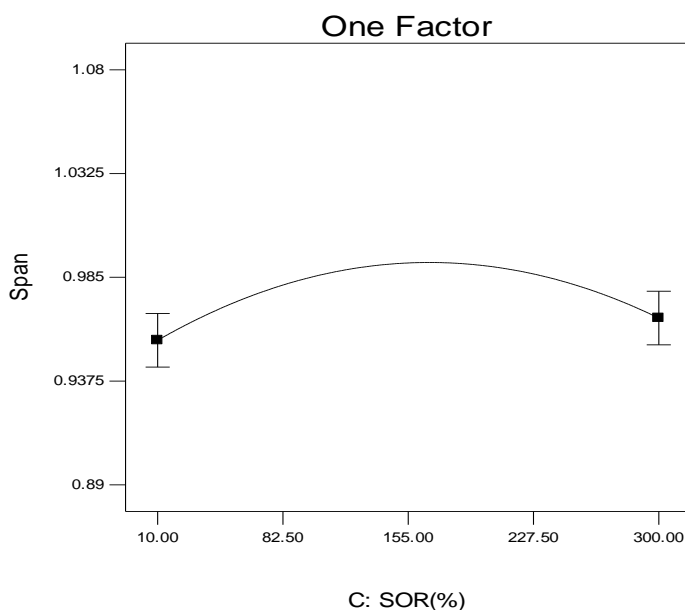
X1 = C: SOR(%)

Actual Factors

A: Omega 3(%) = 50.00

B: Storage Time(day) = 30.50

D: Surfactant type = Average



شکل ۵- نمودار تک فاکتوره تاثیر مقدار SOR بر توزیع اندازه ذرات

Design-Expert® Software

Span

■ D1 SC

▲ D2 T80

◆ D3 T20

● D4 T8020

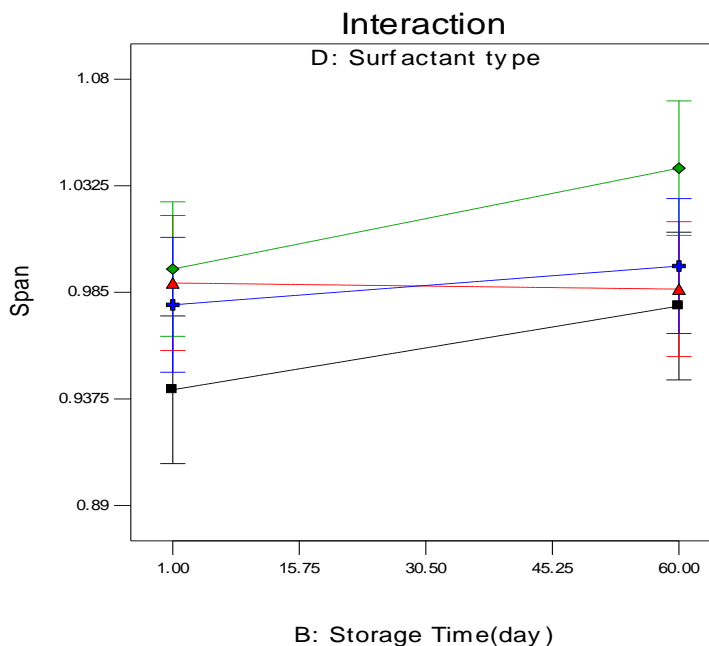
X1 = B: Storage Time(day)

X2 = D: Surfactant type

Actual Factors

A: Omega3(%) = 50.00

C: SOR(%) = 155.00



شکل ۶- نمودار برهمکنش تاثیر مدت زمان نگهداری و نوع سورفاکتانت بر توزیع اندازه ذرات

مخلوط توئین‌ها تغییرات معنی‌داری نداشتند، تغییرات اسپن در نمونه‌های حاوی سورفاکتانت پروتئینی کمتر بوده است که نشانگر

همانطور که در شکل ۶ مشاهده می‌گردد، در طول مدت زمان نگهداری شاخص اسپن در نمونه‌های حاوی سورفاکتانت‌های توئین ۲۰ و کازئینات سدیم افزایش یافت و در نمونه‌های حاوی توئین ۸۰ و

سورفاکتانت می‌باشند. با توجه به نتایج آنالیز واریانس تغییرات کدورت ذرات نانوامولسیون، مدل نهایی دارای سطح معنی‌دار $P < 0.0001$ ، ضریب عدم برازش غیرمعنی‌دار، ضرائب تبیین و تبیین اصلاح شده به ترتیب 0.889 و 0.809 می‌باشند. نتایج حاصل از این تست‌ها نشان می‌دهد که مدل نهایی ارائه شده کارآمد بوده و قادر است به‌طور رضایت بخش میزان کدورت را در نمونه‌ها توجیه نماید. بر اساس آنالیز واریانس اثرات خطی پارامترهای درصد SOR و نوع سورفاکتانت، اثرات درجه دوم میزان امگا سه، درصد SOR و مدت زمان نگهداری بر تغییرات کدورت معنی‌دار بودند و اثرات متقابل میزان امگا سه در مدت زمان نگهداری و درصد SOR در نوع سورفاکتانت تاثیر معنی‌داری داشته است و بالاترین تاثیر مربوط به اثر خطی درصد SOR می‌باشد.

پایداری سورفاکتانت پروتئینی در طول مدت زمان نگهداری در مقایسه با سورفاکتانت‌های کوچک مولکولی می‌باشد.

تغییرات کدورت نانوامولسیون اسانس پونه کوهی ایرانی

حاوی اسیدهای چرب امگا سه

آنالیز داده‌های آزمایش نشان داد که تغییرات کدورت نانوامولسیون اسانس پونه کوهی ایرانی حاوی اسیدهای چرب امگا سه را می‌توان با معادله زیر توصیف کرد.

$$\text{Turbidity} = 0.83394 - 0.02328 A - 0.05882 B - 0.40599 C + 0.12491 D_1 + 0.33206 D_2 - 0.30410 D_3 - 0.46257 AB + 0.50053 CD_1 - 0.28908 CD_2 - 0.40159 A^2 + 0.68493 B^2 - 0.41358 C^2 \quad (10)$$

در معادله فوق ضرائب A، B، C، D به ترتیب نشانگر مقدار امگا سه (درصد)، مدت زمان نگهداری (روز)، درصد SOR و نوع

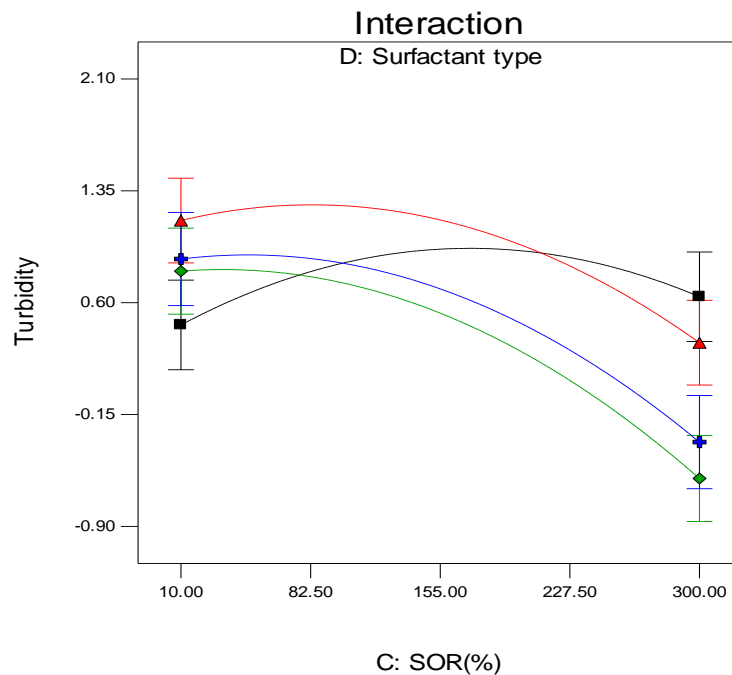
Design-Expert® Software

Turbidity

- D1 SC
- ▲ D2 T80
- ◆ D3 T20
- D4 T80:20

X1 = C: SOR(%)
X2 = D: Surfactant type

Actual Factors
A: Omega 3(%) = 50.00
B: Storage Time(day) = 30.50



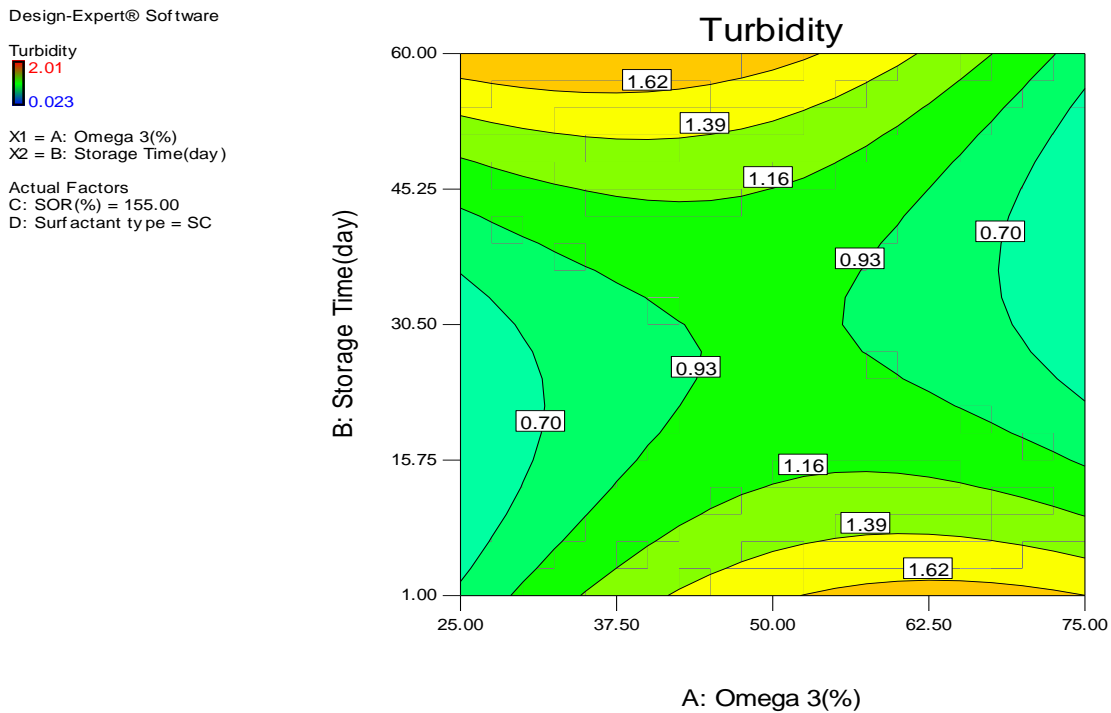
شکل ۷- نمودار برهم‌کنش درصد SOR و نوع سورفاکتانت در بر میزان کدورت در نانوامولسیون‌های پونه کوهی ایرانی

اندازه‌گیری میانگین قطر ذرات در نانوامولسیون پونه کوهی ایرانی، میانگین قطر ذرات در فرمولاسیون‌های حاوی سورفاکتانت کارژینات سدیم تغییر معنی‌داری نداشت، که این نتایج با نتایج حاصل از کدورت همخوانی دارد. همزمان با افزایش مقدار امگا سه و افزایش مدت زمان نگهداری تا ۳۰ روز ابتدا میزان کدورت کاهش و سپس با افزایش مدت زمان نگهداری تا ۶۰ روز میزان کدورت افزایش یافت (شکل ۸). تغییرات مقدار امگا سه تاثیر چندانی بر میزان کدورت نشان نداد. به

همانطور که در شکل ۷ مشاهده می‌گردد، در فرمولاسیون‌های حاوی سورفاکتانت‌های توئین ۸۰، توئین ۲۰:۸۰ و توئین ۲۰ با افزایش درصد SOR (بیش از ۱۰۰ درصد) میزان کدورت ثابت و سپس با افزایش بیشتر مقدار سورفاکتانت میزان کدورت کاهش داشت. کاهش در میانگین قطر ذرات با افزایش غلظت سورفاکتانت سبب کاهش پراکندگی نور و کاهش در کدورت گردید. تغییرات کدورت در حضور سورفاکتانت کارژینات سدیم معنی‌دار نبود. با توجه به نتایج حاصل از

افزایش می‌یابد، افزایش مقدار امگا سه، به دلیل افزایش اندازه ذرات و اینکه ذرات امگا سه آزاد در محیط پراکنده هستند میزان کدورت را بیشتر خواهد کرد، اما در مقادیر بالای امگا سه در طول مدت زمان نگهداری کاهش در میزان کدورت مشاهده گردید که علت آن را افزایش شاخص خامه ای شدن می توان دانست، که با صعود ذرات به سطح نمونه‌ها، محلول باقی مانده شفاف‌تر خواهد بود.

عبارتی با گذشت زمان نگهداری، افزایش در مقدار امگا سه میزان کدورت تغییری نیافت. در هر سطح از امگا سه، افزایش در مدت زمان نگهداری ابتدا سبب کاهش میزان کدورت و سپس افزایش کدورت را سبب گردید. مدت زمان نگهداری تاثیر بالاتری نسبت به مقدار امگا سه داشته است. با توجه به اینکه در طول مدت نگهداری، میانگین قطر ذرات افزایش داشت، بنابراین با افزایش اندازه ذرات پراکنش نوری نیز افزایش می‌یابد و در نتیجه میزان کدورت نمونه‌ها نیز



شکل ۸- کانتور پلات دو بعدی تاثیر مقدار امگا سه و مدت زمان نگهداری بر تغییرات کدورت

$$\text{Creaming I(\%)} = 12.38065 + 1.74435A + 3.5819B - 2.15590C + 1.98619D_1 - 0.86356D_2 - 0.93280D_3 - 3.0271AD_1 + 0.27812AD_2 + 2.40435BC + 5.38830CD_1 - 2.44207CD_2 - 2.36945CD_3 \quad (11)$$

در معادله فوق ضرائب A, B, C, D به ترتیب نشانگر مقدار امگا سه (درصد)، مدت زمان نگهداری (روز)، درصد SOR و نوع سورفاکتانت می‌باشند. با توجه به نتایج آنالیز واریانس اندیس خامه‌ای شدن، مدل نهایی عدد F دارای سطح معنی‌دار بالا، $P < 0.0001$ ، شاخص عدم برآزش غیرمعنی‌دار، ضرائب تبیین و تبیین اصلاح شده به ترتیب ۰/۸۴۸ و ۰/۷۳۹ می‌باشند. نتایج حاصل از این تست‌ها نشان می‌دهد که مدل نهایی ارائه شده کارآمد بوده و قادر است به‌طور رضایت‌بخش اندیس خامه‌ای شدن را در نمونه‌ها توجیه نماید. بر اساس آنالیز واریانس، اثرات خطی پارامترهای مقدار امگا سه، مدت

اندازه‌گیری تغییرات اندیس خامه‌ای شدن نانوامولسیون‌های اسانس پونه کوهی حاوی اسیدهای چرب امگا سه

یکی از آزمون‌های مهم تعیین پایداری سیستم‌های کلوئیدی اندازه‌گیری اندیس خامه‌ای شدن می‌باشد، هرچه اندیس خامه‌ای شدن کمتر باشد، نشانگر پایداری سیستم است. چگالی قطرات فاز پراکنده با چگالی فاز پیوسته متفاوت می‌باشد، اگر چگالی قطرات فاز پراکنده کمتر باشد مطابق قانون استوک آنها تمایل دارند که در سطح نمونه‌ها تجمع پیدا کنند که این پدیده را رو نشینی یا خامه‌ای شدن یا نوعی پدیده تفکیک گرانشی می‌نامند. آنالیز داده‌های آزمایش نشان داد که تغییرات اندیس خامه‌ای شدن در نمونه‌های نانوامولسیون اسانس پونه کوهی حاوی اسیدهای چرب امگا سه را می‌توان با معادله زیر توصیف کرد.

داشته است و بالاترین تاثیر مربوط به اثر خطی مدت زمان نگهداری می‌باشد.

زمان نگهداری و درصد SOR و اثرات متقابل مدت زمان نگهداری در درصد SOR و درصد SOR در نوع سورفاکتانت تاثیر معنی‌داری

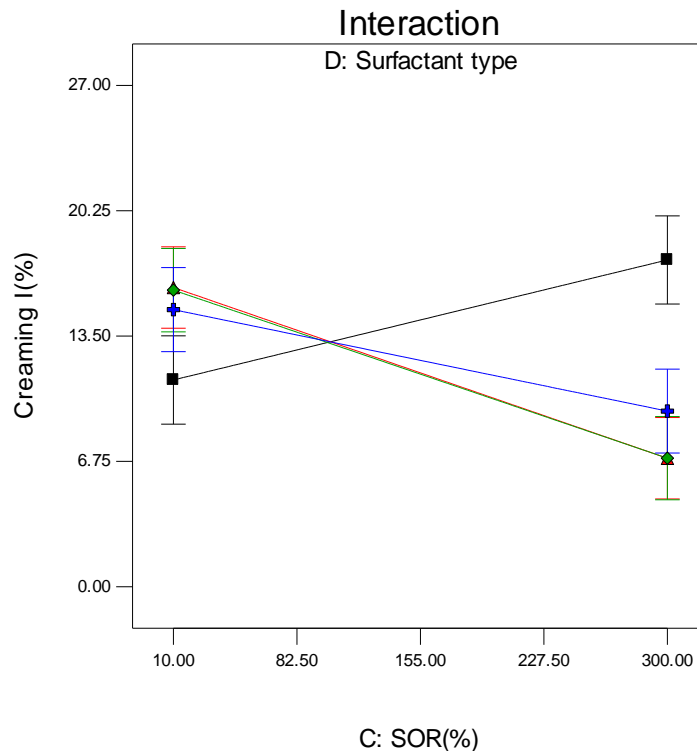
Design-Expert® Software

Creaming I (%)

- D1 SC
- ▲ D2 T80
- ◆ D3 T20
- D4 T80:20

X1 = C: SOR(%)
X2 = D: Surfactant type

Actual Factors
A: Omega 3(%) = 50.00
B: Storage Time(day) = 30.50



شکل ۹- نمودار برهمکنش تاثیر درصد SOR و نوع سورفاکتانت بر میزان اندیس خامه‌ای شدن

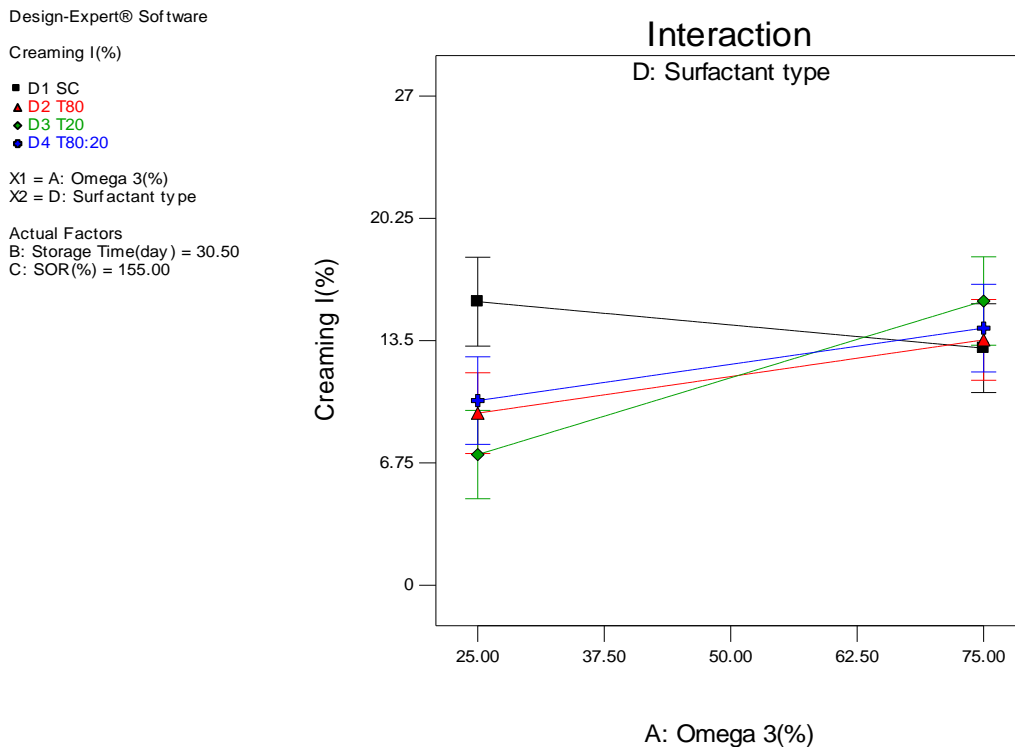
به مکانیسم تهی شدن فلوکولاسیونی (انبوهش) میسل‌های سورفاکتانت جذب نشده و افزایش فشار اسمزی در سیستم در نتیجه انتقال فاز پیوسته از میان ذرات و وقوع انبوهش ناشی از تهی شدن فاز پیوسته بین دو ذره مرتبط می‌باشد که بیانگر این نکته هست که غلظت کمتر سورفاکتانت کازئینات سدیم تاثیر بهتری داشته است و با افزایش مقدار آن، اتصالات بین خود پروتئین‌ها و یا انبوهش اتفاق افتاده است. این نتیجه با نتایج (وئوق و همکاران ۱۳۸۸ Dichinson *et al.*, 1997)، مطابقت دارد.

همانطور که در شکل ۱۰ مشاهده می‌گردد، افزایش در مقدار امگا سه در تمامی فرمولاسیون‌ها به جز کازئینات سدیم افزایش در میزان اندیس خامه‌ای شدن را سبب گردید، تغییرات در حضور سورفاکتانت پروتئینی معنی‌دار نبود. افزایش مقدار فاز روغنی از طریق چند مکانیسم منجر به ناپایدار شدن سیستم نانوامولسیون و وقوع پدیده خامه‌ای شدن گردید: اول اینکه افزایش مقدار امگا سه، مطابق نتایج آزمون اندازه‌گیری میانگین قطر ذرات، باعث افزایش میانگین اندازه ذرات می‌گردد و مطابق قانون استوک افزایش در قطر ذرات، صعود ذرات بر سطح نمونه‌ها را تسریع نموده و به همین دلیل با

افزایش در مقدار SOR (سورفاکتانت) در فرمولاسیون‌های حاوی توئین‌ها باعث کاهش در میزان اندیس خامه‌ای شدن گردید (شکل ۹) که این نتایج با نتایج آنالیز اندازه ذرات مطابقت داشت با کاهش اندازه ذرات مطابق قانون استوک سرعت خامه‌ای شدن کاهش می‌یابد. پایداری بالاتر نانوامولسیون در برابر پدیده انبوهش به دلیل قطر کوچک آنها بوده است زیرا کاهش قدرت نیروی جاذبه نسبت به نیروی دافعه میان سطح ذرات نانوامولسیون متناسب با کاهش در میانگین قطر ذرات بود، همچنین افزایش در غلظت ذرات و کاهش در میانگین قطر ذرات، منجر به افزایش نسبت ضخامت فیلم سورفاکتانت به شعاع ذرات می‌گردد که این ضخامت نسبی سورفاکتانت می‌تواند ثبات استریک بهتری در برابر مکانیسم‌های ناپایداری ایجاد می‌کند و ثابا موجب افزایش ویسکوزیته می‌گردد و در نتیجه از دو مکانیسم ناپایدارکنندگی مهم یعنی تفکیک گرانشی و انبوهش جلوگیری می‌شود. در بین سورفاکتانت‌های ریزمولکولی تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید. در مورد نانوامولسیون‌های حاوی سورفاکتانت کازئینات سدیم، با افزایش غلظت سورفاکتانت اندیس خامه‌ای شدن روند افزایشی نشان داد، در غلظت بالای سورفاکتانت کازئینات سدیم

قانون استوک، سرعت دو فاز شدن افزایش می‌یابد. در بین تمامی سورفاکتانت‌ها با افزایش غلظت امگا سه، سورفاکتانت کازینات سدیم عملکرد بهتری در جلوگیری از حرکت ذرات روغن و صعود به سطح ذرات داشته است. Chen و همکاران (۲۰۱۵) مشاهده کردند که نانوامولسیون روغن نعنای فلفلی به علت رسیدگی استواید در طی دوران نگهداری رشد داشته است.

افزایش مقدار امگا سه اندیس خامه‌ای شدن افزایش قابل توجهی نشان داد. دلیل دوم: با افزایش مقدار امگا سه، نسبت SOR کاهش یافته (مقدار کمتر سورفاکتانت) و در نتیجه عدم پوشش کافی قطرات توسط سورفاکتانت و ایجاد اتصال بین ذرات روغن باعث رشد ذرات گردید و صعود آنها به سطح نمونه‌ها بیشتر خواهد شد. دلیل سوم هرچه غلظت فاز پراکنده بیشتر شود، کسر حجمی افزایش یافته و اختلاف دانسیته میان فازهای پراکنده و پیوسته بیشتر شده و مطابق



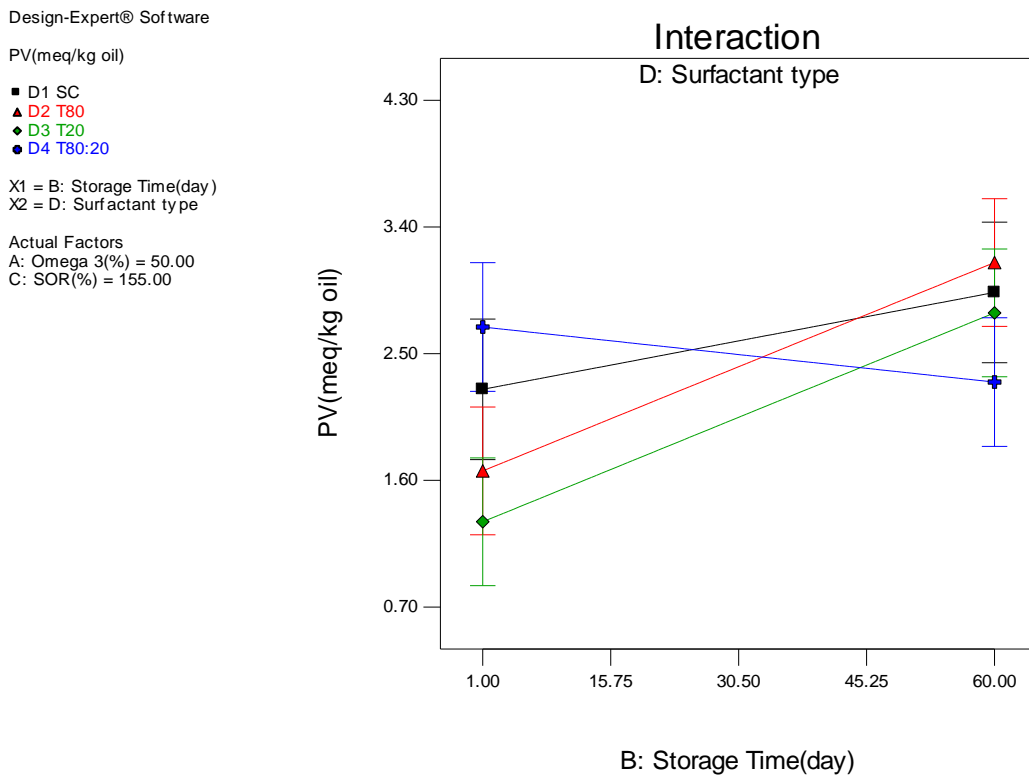
شکل ۱۰- نمودار برهمکنش تاثیر مقدار امگا سه و نوع سورفاکتانت بر تغییرات اندیس خامه‌ای شدن

پراکسید ذرات نانوامولسیون، مدل نهایی دارای سطح معنی‌دار $P < 0.001$ ، شاخص عدم برازش غیرمعنی‌دار، ضرائب تبیین و تبیین اصلاح شده به ترتیب ۰/۹۰۲ و ۰/۸۱۱ می‌باشند. نتایج حاصل از این تست‌ها نشان می‌دهد که مدل نهایی ارائه شده کارآمد بوده و قادر است به‌طور رضایت‌بخش مقدار اندیس پراکسید را در نمونه‌ها توجیه نماید. بر اساس آنالیز واریانس اثرات خطی مقدار امگا سه و مدت زمان نگهداری و اثرات متقابل مقدار امگا سه و نوع سورفاکتانت، مدت زمان نگهداری در درصد SOR و مدت زمان نگهداری در نوع سورفاکتانت و اثرات درجه دوم مقدار امگا سه و درصد SOR تاثیر معنی‌داری داشته است و بالاترین تاثیر مربوط به اثر خطی مدت زمان نگهداری می‌باشد.

میزان اندیس پراکسید نانوامولسیون‌های اسانس پونه کوهی ایرانی حاوی اسیدهای چرب امگا سه آنالیز داده‌های آزمایش نشان داد که تغییرات اندیس پراکسید در نمونه‌های نانوامولسیون اسانس پونه کوهی ایرانی حاوی اسیدهای چرب امگا سه را می‌توان با معادله زیر توصیف کرد.

$$PV(\text{ meq/kg}) = 2.38467 + 0.37091 A + 0.40767 B - 0.10219 C + 0.20590 D_1 + 0.02228 D_2 - 0.337085 D_3 - 0.76881 AD_1 + 0.18405 AD_2 + 0.19396 AD_3 + 0.59191 BC + 0.06354 BD_1 + 0.33248 BD_2 + 0.32435 BD_3 + 1.8300 A^2 + 1.33485 C^2 \quad (12)$$

در معادله فوق ضرائب A، B، C، D به ترتیب نشانگر مقدار امگا سه (درصد)، مدت زمان نگهداری (روز)، درصد SOR و نوع سورفاکتانت می‌باشند. با توجه به نتایج آنالیز واریانس میزان اندیس



شکل ۱۱- نمودار برهمکنش تاثیر متقابل مدت زمان نگهداری و نوع سورفاکتانت بر تغییرات اندیس پراکسید

سورفاکتانت اندیس پراکسید کمتری داشت و غیراشباع بودن توئین ۸۰ و عدم انعطاف‌پذیری توئین ۲۰ و ایجاد منفذ در سطح ذرات در طی مدت زمان نگهداری باعث افزایش در اندیس پراکسید گردید. در تحقیقات متعددی گزارش گردید که با افزایش زمان نگهداری نمونه‌های روغن در شرایط اکسایش، میزان اندیس پراکسید و اندیس اسید تیوباربتوریک افزایش و در نتیجه فعالیت آنتی‌اکسیدانی کاهش یافت (Donnelly *et al.*, 1998; Villiere *et al.*, 2010; Cheng *et al.*, 2005; Tan *et al.*, 2016) و همکاران (۲۰۱۶) افزایش نرخ اکسیداسیون با گذشت مدت زمان در میکروانکسپولاسیون‌ها مشاهده شد. در تحقیقات انجام شده توسط Lim و همکاران (۲۰۱۲) گزارش گردید که انکسپولاسیون روغن Red-Fleshed Pitaya گونه‌ای از میوه کاکتوس با سورفاکتانت کارژینات سدیم، اندیس پراکسید با افزایش مدت زمان نگهداری از ۱۰/۵۶ به ۵۹/۰۹ میلی‌اکی‌والان بر کیلوگرم افزایش یافت.

همانطور که در شکل ۱۲ مشاهده می‌شود، افزایش مقدار امگا سه تا سطح ۵۰ درصد، ابتدا سبب افزایش در میزان اندیس پراکسید گردید و با افزایش بیشتر مقدار امگا سه، میزان اندیس پراکسید کاهش معنی‌داری یافته است.

همانطور که در شکل ۱۱ نشان داده شده است، در طول مدت زمان نگهداری در تمامی فرمولاسیون‌ها به جز توئین ۸۰:۲۰ میزان اندیس پراکسید افزایش یافته است. مطابق نتایج آنالیز میانگین اندازه ذرات، در طول مدت زمان نگهداری به علت حرکت براونی ذرات و تماس ذرات با یکدیگر میانگین قطر ذرات نیز افزایش یافت، در نتیجه احتمالاً به دلیل ادغام ذرات، دسترسی رادیکال‌های آزاد و فلزات واسطه به ذرات چربی نیز تسهیل می‌شود و اندیس پراکسید افزایش می‌یابد و همچنین در مدت زمان نگهداری به دلیل مصرف بیشتر ترکیبات موثر در اسانس‌ها در مقابله با عوامل پراکسیدانی و به دلیل تخریب ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و فنولیک در طول نگهداری اثرشان از بین رفته و حتی این ترکیبات می‌توانند به‌عنوان پراکسیدان عمل کنند و میزان اندیس پراکسید در طول مدت زمان نگهداری افزایش می‌یابد. یکی دیگر از دلایل افزایش اندیس پراکسید این است که، علیرغم اثرات مثبت سورفاکتانت‌ها، خود سورفاکتانت‌ها می‌توانند سبب افزایش سرعت اکسیداسیون گردد، به عبارتی دیگر گروه پلی‌اترها در ساختار سر سورفاکتانت توئین‌ها به آسانی اکسیده می‌شوند و هیدروپراکسیدها را تشکیل می‌دهند و همچنین وجود ناخالصی‌های همراه سورفاکتانت‌ها مانند فلزات واسطه و اسیدهای چرب آزاد می‌تواند سبب تسریع اکسیداسیون گردد. نمونه‌های حاوی مخلوط

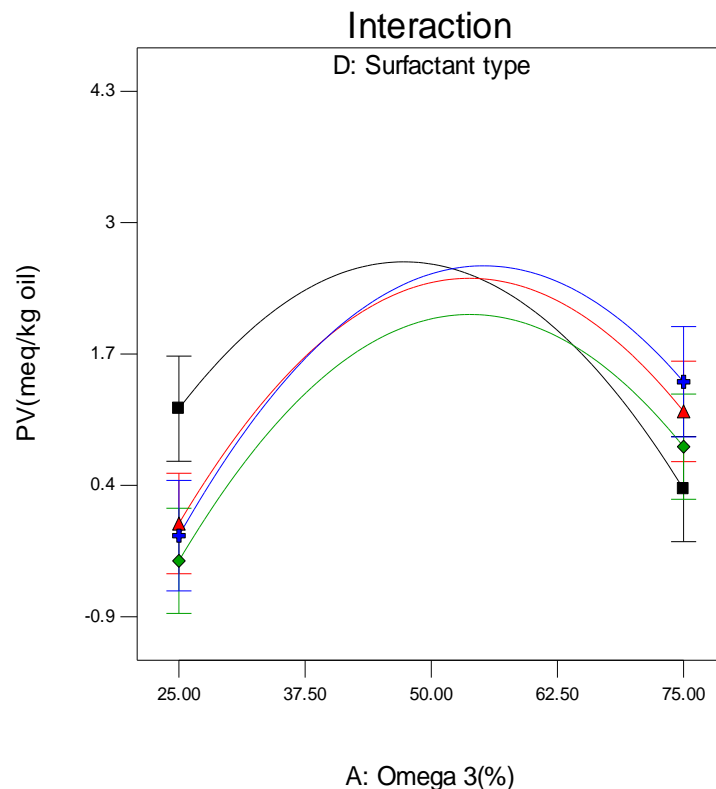
Design-Expert® Software

PV(meq/kg oil)

- D1 SC
- ▲ D2 T80
- ◆ D3 T20
- D4 T80:20

X1 = A: Omega 3(%)
X2 = D: Surfactant type

Actual Factors
B: Storage Time(day) = 30.50
C: SOR(%) = 155.00



شکل ۱۲- نمودار برهمکنش تاثیر متقابل مقدار امگا سه و نوع سورفاکتانت بر میزان اندیس پراکسید

افزایش بیشتر میزان امگا سه، اندیس پراکسید کاهش نشان داد که کاهش در اندیس پراکسید با افزایش مقدار امگا سه، دلیلی بر ممانعت از اکسیداسیون نمی‌تواند باشد که می‌تواند مرتبط به تجزیه ترکیبات هیدروپراکسید و تشکیل ترکیبات جانبی ثانویه حاصل از اکسیداسیون می‌باشد. Wang و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند که در انکپسولاسیون روغن ماهی حاوی هگزادکانوئیک اسید با سورفاکتانت پروتئین آب پنیر، با افزایش مقدار روغن و کاهش میزان سورفاکتانت اندیس پراکسید افزایش یافت. در مطالعه‌ای Dłuzewska و همکاران (۲۰۰۶) بیان کردند که افزایش فاز روغنی سبب افزایش اندازه ذرات امولسیون نوشیدنی و افزایش اندیس پراکسید گردید.

همانطور که در شکل ۱۳ مشاهده می‌شود با افزایش مقدار سورفاکتانت، اندیس پراکسید ابتدا کاهش و سپس افزایش داشته است و میان سورفاکتانت‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید. با افزایش غلظت سورفاکتانت و کاهش اندازه ذرات، اندیس پراکسید روند کاهشی نشان داد، که می‌توان مربوط به پوشش سطح ذرات چربی توسط سورفاکتانت‌ها، افزایش ضخامت لایه سورفاکتانت و محافظت از تماس مستقیم با عوامل پراکسیدانی باشد و سپس با افزایش بیشتر سورفاکتانت به دلیل وقوع پدیده ادغام ذرات و در نتیجه امکان نشت

اسانس پونه کوهی حاوی مقادیر بالایی از ترکیبات فنولیکی مانند کاراوکروول، تیمول، اتوژنول و ترکیباتی مانند منتول، پیپریتون، پیپریتون اکسید و پولگون بوده که به صورت موثری به عنوان دهنده هیدروژن عمل نموده و لذا به عنوان یک آنتی‌اکسیدان موثر عمل می‌کنند، افزایش در مقدار امگا سه سبب کاهش میزان اسانس می‌گردد و بنابراین میزان اسانس کمتری برای محافظت از اکسیداسیون امگا سه فعالیت می‌کند که منجر به کاهش خاصیت آنتی‌اکسیدانی و بازداری کمتر از اکسیداسیون می‌شود و اندیس پراکسید تا حدودی افزایش خواهد یافت. این نتایج با نتایج تحقیق Ahn و همکاران (۲۰۰۸) مطابقت داشت که آنها گزارش کردند که کاهش در اندیس پراکسید و اندیس آنیزیدین در میکروانکپسولاسیون روغن آفتابگردان حاوی اولئیک بالا به همراه عصاره رزماری مشاهده گردید. مطابق آنالیزهای اندازه ذرات و اندیس خامه‌ای شدن با افزایش مقدار امگا سه میزان اندازه ذرات هم بزرگتر می‌باشد و به عبارتی سیستم ناپایدار شده و پدیده‌های انبوهش رخ داده، که در طی فرایند، عوامل پراکسیدان به علت تمایل بالا به لیپیدها در معرض ذرات چربی قرار می‌گیرند و در غلظت‌های بالاتر امگا سه، پدیده خامه‌ای شدن تقویت گردیده و سبب صعود ذرات چربی به سطح شود. اما با

و به تعویق انداختن اکسیداسیون موثر بودند. با افزایش میزان سورفاکتانت، میزان اسانس کاهش یافته و در نتیجه خاصیت بازدارنده اکسیداسیون در برخی فرمولاسیون‌ها کمتر گردید. Zhong و Chen (۲۰۱۵) با مطالعه بر نانوامولسیون بتاکارتن در اسانس آویشن در حضور سورفاکتانت‌های پروتئین آب پنیر و لستین نتیجه گرفتند به علت خاصیت آنتی‌اکسیدانی اسانس آویشن و لستین میزان اکسیداسیون کاهش می‌یابد

ترکیبات ذرات چربی به محیط وجود داشته و بنابراین سبب افزایش اندیس پراکسید می‌گردد. از طرفی افزایش غلظت سورفاکتانت‌ها، اکسیژن محلول درون ساختار بیشتر شده که می‌تواند باعث افزایش اندیس پراکسید باشد. قابل ذکر است، اسانس روغنی بومی پونه کوهی نه تنها به‌عنوان عامل عطر و طعمی، بلکه دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و خواص ضد میکروبی می‌باشد، در اسانس پونه کوهی ترکیباتی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی مانند لیمونین، پولگون، کارون، تیمول و کاراوکروول وجود داشته که در کاهش اندیس پراکسید

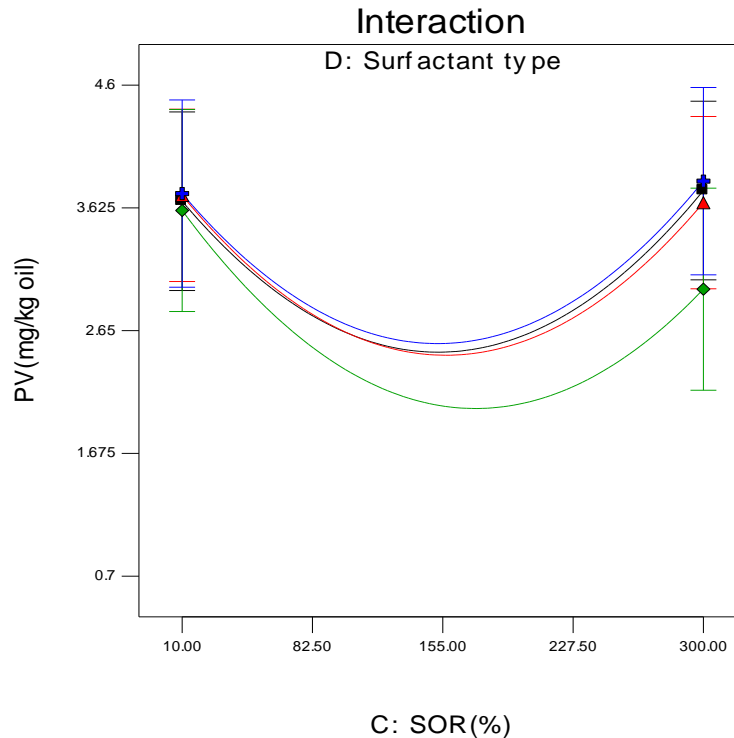
Design-Expert® Software

PV(mg/kg oil)

- D1 SC
- ▲ D2 T80
- ◆ D3 T20
- D4 T80:20

X1 = C: SOR(%)
X2 = D: Surfactant type

Actual Factors
A: Omega3(%) = 50.00
B: Storage Time(day) = 30.50



شکل ۱۳- نمودار برهمکنش تاثیر متقابل درصد SOR و نوع سورفاکتانت بر اندیس پراکسید

تیوباریتوریک اسید ذرات نانوامولسیون، مدل نهایی دارای سطح معنی‌دار $P < 0.0001$ ، شاخص عدم برازش غیرمعنی‌دار می‌باشند. ضرائب تبیین و تبیین اصلاح شده به ترتیب ۰/۸۱۷ و ۰/۷۴۲ بودند. نتایج حاصل از این تست‌ها نشان می‌دهد که مدل نهایی ارائه شده کارآمد بوده و قادر است به‌طور رضایت بخش اندیس تیوباریتوریک اسید را در نمونه‌ها توجیه نماید. بر اساس آنالیز واریانس اثرات خطی مدت زمان نگهداری و اثرات متقابل مدت زمان نگهداری و اثر درجه دوم مقدار امگا سه تاثیر معنی‌داری داشته است.

همانطور که در شکل ۱۴ مشاهده می‌گردد، فرمولاسیون‌های حاوی سورفاکتانت‌های توئین ۸۰ و توئین ۸۰:۲۰ با گذشت مدت زمان نگهداری تغییرات اندیس تیوباریتوریک معنی‌دار نبودند، اما در

اندیس تیوباریتوریک اسید نانوامولسیون‌های اسانس پونه کوهی حاوی اسیدهای چرب امگا سه

آنالیز داده‌های آزمایش نشان داد که تغییرات اندیس تیوباریتوریک اسید در نمونه‌های نانوامولسیون اسانس پونه کوهی حاوی اسیدهای چرب امگا سه را می‌توان با معادله زیر توصیف کرد.

$$TBA(mg \text{ mad/kg}) = 0.41680 + 0.02801 A \quad (13)$$

$$+ 0.05336 B + 0.00606 D_1 + 0.05197 D_2 - 0.02659 D_3 + 0.054638 BD_1 + 0.07613 BD_2 + 0.09955 BD_3 - 0.25791 A^2$$

در معادله فوق ضرائب A، B، C، D به ترتیب نشانگر مقدار امگا سه (درصد)، مدت زمان نگهداری (روز)، درصد SOR و نوع سورفاکتانت می‌باشند. با توجه به نتایج آنالیز واریانس اندیس

بیشتری در طول مدت نگهداری داشتند و تغییراتی در اندیس تیوباریتوریک اسید مشاهده نگردید و به گونه‌ای از پیشرفت اکسیداسیون جلوگیری کرده‌اند اما توئین ۲۰ و پروتئین کازئینات سدیم فاقد این توانایی بودند. Lee و همکاران (۲۰۱۱) مقدار بالای اندیس تیوباریتوریک اسید در طی دوران نگهداری نانوامولسیون روغن نارنگی در ذرات را نتیجه گرفتند. Mancuso و همکاران (۲۰۰۰) گزارش کردند که توئین ۲۰ حاوی ۱۳/۷ میکرومول پراکسید بر هر گرم بوده و به علت تماس کامل چربی با پراکسیدهای سورفاکتانت می‌تواند سبب تسریع اکسیداسیون گردد. Donnelly و همکاران (۱۹۹۸) بیان کردند، افزودن سورفاکتانت توئین ۲۰ در فاز آبی باعث افزایش اندیس پراکسید و تیوباریتوریک اسید شده است. در مطالعه ای توئین ۲۰ سبب افزایش هیدروپراکسیدها و افزایش نرخ اکسیداسیونی در امولسیون روغن سالمون شده است (Berton و همکاران ۲۰۱۱).

فرمولاسیون‌های حاوی سورفاکتانت‌های توئین ۲۰ و کازئینات سدیم افزایش معنی‌داری در اندیس تیوباریتوریک اسید را نشان می‌دهد. این نتایج با روند اندیس پراکسید در طول مدت نگهداری همخوانی داشت. در طول مدت نگهداری، بر اساس نتایج حاصل از شاخص اسین و اندازه‌گیری میانگین قطر ذرات، ذرات اندازه‌های غیریکسان داشته و بر اثر مکانیسم‌های ناپایدارکنندگی مانند انبوهش و ادغام و به‌ویژه رسیدگی استوالد رشد ذرات مطابق اندیس خامه‌ای شدن مشاهده گردید، به همین دلیل سرعت اکسیداسیون و متعاقباً افزایش اندیس تیوباریتوریک تسریع گردید و همچنین اکسیداسیون خود سورفاکتانت مانند توئین ۲۰ می‌تواند سبب افزایش اندیس تیوباریتوریک اسید گردد. در طی مدت نگهداری خاصیت آنتی‌اکسیدانی موجود در سیستم کاهش یافته و متعاقباً اندیس تیوباریتوریک افزایش یافت، اگرچه در حضور فاز روغنی اسانس پونه کوهی ایرانی نمونه‌های حاوی توئین ۸۰ و مخلوط توئین‌ها پایداری

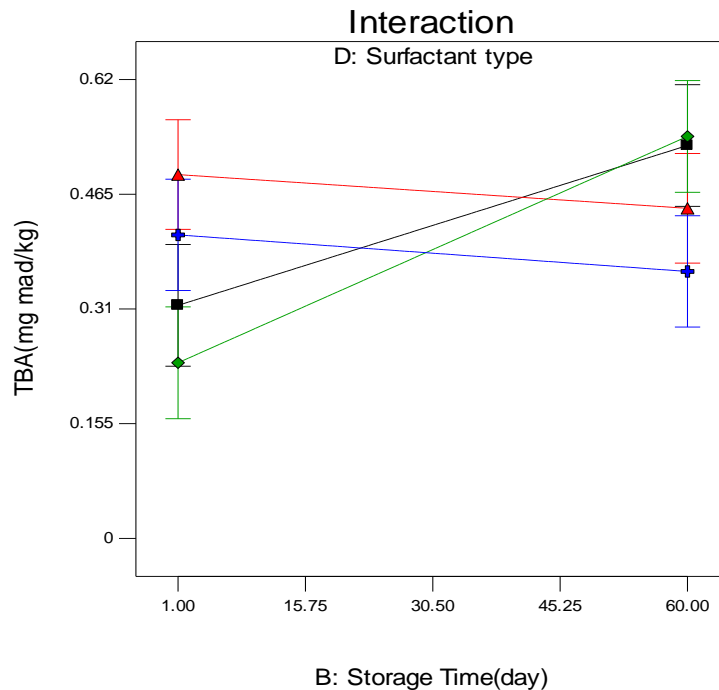
Design-Expert® Software

TBA(mg mad/kg)

- D1 SC
- ▲ D2 T80
- ◆ D3 T20
- D4 T80:20

X1 = B: Storage Time(day)
X2 = D: Surfactant type

Actual Factors
A: Omega 3(%) = 50.00
C: SOR(%) = 155.00



شکل ۱۴- نمودار برهمکنش تاثیر متقابل مدت زمان نگهداری و نوع سورفاکتانت بر تغییرات اندیس تیوباریتوریک اسید

می‌شود. در این حالت رنگ بنفش محیط به رنگ زرد تبدیل می‌شود از روی اندازه‌گیری کاهش شدت جذب به‌وسیله طیف‌سنجی می‌توان به خصوصیات آنتی‌اکسیدانی آن پی برد (Chen et al., 2013). آنالیز داده‌های آزمایش نشان داد که خاصیت آنتی‌اکسیدانی در نمونه‌های نانوامولسیون اسانس پونه کوهی حاوی اسیدهای چرب امگا سه را می‌توان با معادله زیر توصیف کرد.

خاصیت آنتی‌اکسیدانی نانوامولسیون اسانس پونه کوهی حاوی اسیدهای چرب امگا سه

استفاده از رادیکال DPPH جهت بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی اسانس‌های گیاهی یکی از پرکاربردترین روش‌های سنجش قدرت آنتی‌اکسیدانی تبدیل شده است. اساس این روش این است که رادیکال DPPH به‌عنوان پذیرنده الکترون از یک مولکول آنتی‌اکسیدان عمل می‌کند در نتیجه آن DPPH به 2DPPH تبدیل

آنتی‌اکسیدانی ذرات نانوامولسیون، مدل نهایی دارای سطح معنی‌دار $P < 0.001$ عدم برآزش غیرمعنی‌دار می‌باشند. ضرائب تبیین و تبیین اصلاح شده به ترتیب 0.873 و 0.843 بودند، نتایج حاصل از این تست‌ها نشان می‌دهد که مدل نهایی ارائه شده کارآمد بوده و قادر است به‌طور رضایت‌بخش خاصیت آنتی‌اکسیدانی را در نمونه‌ها توجیه نماید.

$$\text{Antioxidant activity} = 60.08502 - 4.77041A - 1.41746B + 7.02592C + 4.28374D_1 + 4.45420D_2 + 2.43589D_3 \quad (14)$$

در معادله فوق ضرائب A، B، C، D به ترتیب نشانگر مقدار امگا سه (درصد)، مدت زمان نگهداری (روز)، درصد SOR و نوع سورفاکتانت می‌باشند. با توجه به نتایج آنالیز واریانس میزان خاصیت

Design-Expert® Software

DPPH inhibition(%)

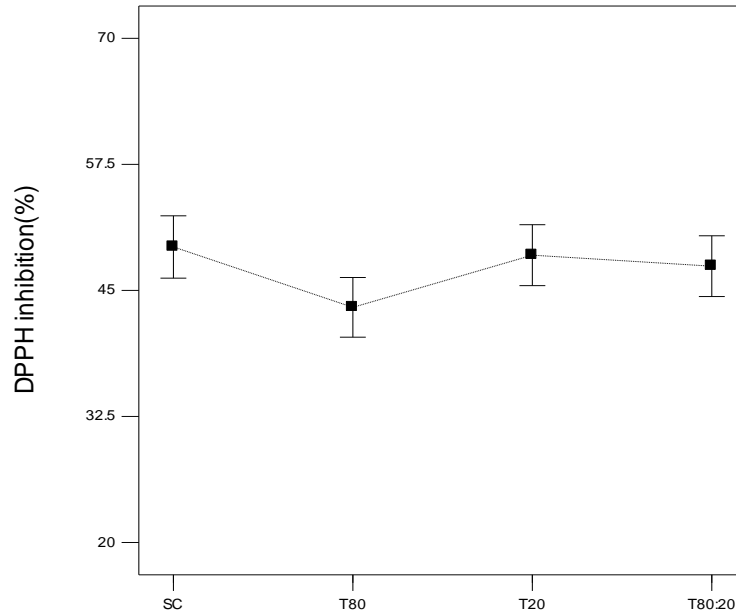
X1 = D: Surfactant type

Actual Factors

A: Omega3(%) = 50.00

B: Storage Time(day) = 30.50

C: SOR(%) = 155.00



D: Surfactant type

شکل ۱۵- نمودار تک فاکتور تاثیر نوع سورفاکتانت بر تغییرات خاصیت آنتی‌اکسیدانی

به دام‌اندازی عوامل پراکسیدانی می‌باشد، اما در اینجا افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدانی به این علت نبوده، زیرا اساس واکنش با DPPH می‌باشد، به دلیل ساختار هتروژن این پروتئین احتمال خروج ترکیبات به درون محلول و واکنش با ترکیب DPPH وجود داشته که سبب افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدانی گردیده است.

در شکل ۱۶ مشاهده می‌شود که افزایش در مقدار SOR و مقدار امگا سه، خاصیت آنتی‌اکسیدانی کاهش یافته است. خاصیت آنتی‌اکسیدانی فرمولاسیون‌ها در درجه اول به‌طور عمده مربوط به ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس پونه کوهی مربوط به ترکیبات منوترپنی اکسیژن‌دار مانند پولگون، کاروون، لینالول، پیرپیتون، بورنتول و دی هیدرو کاروتول و منوترپنی هیدروکربن مانند لیمونین، بتا پینین، کامفن و بتا مایرپسین و ترکیبات فنولیک شامل تیمول و کاراوکروول و به مقدار خیلی کمتر مربوط به توکوفرول‌های موجود در

همانطور که در شکل ۱۵ نشان مشاهده می‌شود، تفاوت معنی‌داری بین سورفاکتانت‌ها نبود، اما بیشترین میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی به ترتیب مربوط به سورفاکتانت کازئینات سدیم، توئین ۲۰ و کمترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به توئین ۸۰، مخلوط توئین‌ها بود، با توجه به اینکه هرچه خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالاتر باشد مطلوب‌تر می‌باشد به دلیل اینکه سورفاکتانت‌ها با پوشاندن کامل سطح ذرات در حفظ خواص آنتی‌اکسیدانی موثر هستند، بنابراین در فرمولاسیون‌هایی که پوشش کامل‌تر سطحی توسط سورفاکتانت‌ها داشتند خاصیت آنتی‌اکسیدانی کمتری نشان دادند. از طرف دیگر آنتی‌اکسیدان‌ها می‌تواند با امولسیفایرها در سطح بینایی باند شوند به دلیل تشکیل باندهای هیدروژنی با هیدروژن‌های درون ساختار آنتی‌اکسیدانی از خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها کاسته می‌شود. در ارتباط با پروتئین کازئینات سدیم، خود دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی به علت

ذرات، تماس موثر میان رادیکال DPPH با اسانس پونه کوهی کمتر می‌گردد به بیان دیگر چون در این روش از فرآیندهای تخریبی جهت برداشتن غشای سطح ذرات استفاده نمی‌گردد واکنش کامل ترکیبات با محلول DPPH کمتر بوده و در نتیجه خاصیت آنتی‌اکسیدانی کمتری نشان دادند. از طرفی اسانس‌های ضروری توانایی به دام‌اندازی فلزات را دارند.

روغن ماهی (۱۰۰۰ ppm) و حضور سورفاکتانت‌ها می‌باشد. علت کاهش خاصیت آنتی‌اکسیدانی را می‌توان با این دلیل توجیه نمود که با افزایش مقدار سورفاکتانت در نانوامولسیون‌ها، میزان فاز روغنی کاهش می‌یابد و در نتیجه میزان اسانس موجود در ساختار نیز کمتر می‌گردد، بنابراین هرچه میزان اسانس پونه کوهی بیشتر باشد خواص آنتی‌اکسیدانی بالاتری را نشان می‌دهد. دلیل دیگر اینکه با افزایش میزان سورفاکتانت و تشکیل شد و غشای محافظتی بر روی سطح

Design-Expert® Software

DPPH inhibition(%)

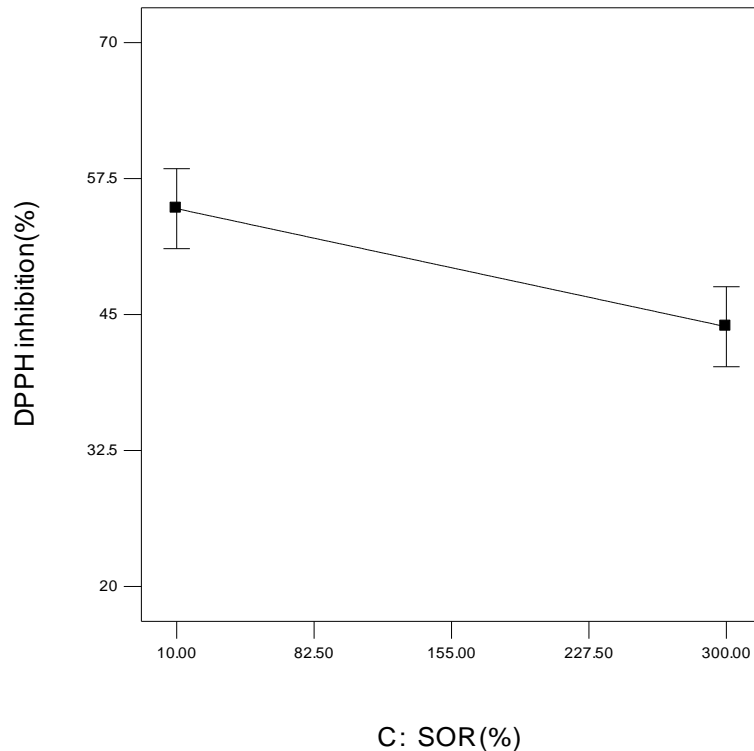
X1 = C: SOR(%)

Actual Factors

A: Omega3(%) = 50.00

B: Storage Time(day) = 30.50

D: Surfactant type = SC



شکل ۱۶- نمودار تک فاکتور تاثیر درصد SOR و مقدار امگا سه بر میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی

در معادله فوق ضرائب A، B، C، D به ترتیب نشانگر مقدار امگا سه (درصد)، مدت زمان نگهداری (روز)، درصد SOR و نوع سورفاکتانت می‌باشند. از مقادیر ضریب تبیین (۰/۹۷۵) و ضریب تبیین اصلاح شده (۰/۹۴۵) مربوط به مدل‌ها می‌توان دریافت که مدل چندجمله‌ای درجه دوم مدلی کارآمد برای ضریب شکست محسوب می‌شود. همانطور که در شکل ۱۷ مشاهده می‌شود با افزایش درصد SOR در تمامی فرمولاسیون‌ها، تغییرات چندانی معنی‌دار نبودند. اگر چه کاهش اندکی در میزان ضریب شکست مشاهده شد، این نتایج با نتایج حاصل از اندازه‌گیری کدورت مطابقت داشته است، که با افزایش میزان سورفاکتانت میزان کدورت کاهش داشت و در نتیجه ضریب شکست کمتر می‌باشد. میان ضریب شکست و کدورت رابطه مستقیم

تغییرات ضریب شکست نانوامولسیون اسانس پونه کوهی

حاوی اسیدهای چرب امگا سه

آنالیز داده‌های آزمایش نشان داد که تغییرات ضریب شکست در نمونه های نانوامولسیون اسانس پونه کوهی حاوی اسیدهای چرب امگا سه را می‌توان با معادله زیر توصیف کرد.

$$RI = 1.3562 + 0.00099 A + 2.34 \times 10^{-5} B + 0.000166C + 0.002897D_1 + 0.000783D_2 + 0.000684D_3 - 0.00234AD_1 - 0.00179AD_2 - 0.00074AD_3 - 0.0008BC - 0.00327BD_1 - 0.00076BD_2 - 0.00035BD_3 - 0.00191CD_1 - 0.00201CD_2 - 0.00158CD_3 + 0.00288B^2 \quad (15)$$

افزایش ضریب شکست گردید. Gensen و همکاران (۲۰۱۴) نتیجه گرفتند میزان ضریب شکست نانومولسیون عصاره داروی گیاهی Serrata Boswellia ۱/۲۸ تا ۱/۹۹ بود و افزایش اندکی در ضریب شکست نمونه‌های حاوی میزان روغن بالاتر مشاهده شد.

وجود دارد. از طرف دیگر هرچه فاز روغنی و کسر حجمی بالاتر باشد میزان ضریب شکست بیشتر می‌گردد، در نتیجه مورد انتظار بود که با افزایش مقدار سورفاکتانت، فاز روغنی کاهش داشته، اندازه ذرات کوچکتر گردیده و میزان ضریب شکست کمتر گردید. Gadkari و Balarama (۲۰۱۵) نتیجه گرفتند که افزایش در اندازه ذرات باعث

Design-Expert® Software

RI

- D1 SC
- ▲ D2 T80
- ◆ D3 T20
- D4 T8020

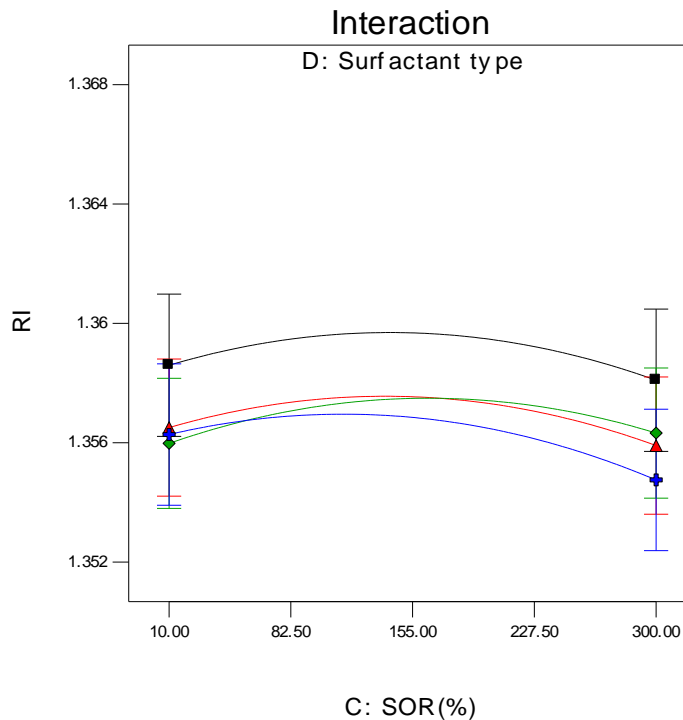
X1 = C: SOR(%)

X2 = D: Surfactant type

Actual Factors

A: Omega3(%) = 50.00

B: Storage Time(day) = 30.50



شکل ۱۷- نمودار برهمکنش تاثیر درصد SOR و نوع سورفاکتانت بر ضریب شکست

که مدل نهایی ارائه شده کارآمد بوده و قادر است به‌طور رضایت بخش تغییرات pH را در نمونه‌ها توجیه نماید..

با گذشت مدت زمان نگهداری میزان pH در تمام فرمولاسیون‌ها به‌جز توئین ۲۰ روند کاهشی داشت (شکل ۱۸)، که این تغییرات با اندیس پراکسید همخوانی داشت، به عبارتی مطابق توضیحات در بخش قبلی، پدیده هیدرولیز ترکیبات اسیدهای چرب و سورفاکتانت‌ها باعث کاهش در pH گردید.

با افزایش مقدار سورفاکتانت، میزان pH نمونه‌ها افزایش نشان داد به عبارتی در مقادیر بالای سورفاکتانت میزان امگا سه که تاثیر زیادی بر میزان pH دارد، کمتر گردید، از طرف دیگر به علت افزایش سورفاکتانت به‌ویژه کازئینات سدیم دارای بار منفی بیشتر میزان pH بیشتر گردید، همانطور که قبلاً هم اشاره شده با اینکه توئین‌ها ترکیبات غیریونی هستند اما میزان اندکی بار منفی نیز دارند که بر روی pH اثرگذار بود، اگرچه مقادیر pH در محدوده طبیعی بود.

pH نانومولسیون اسانس پونه کوهی حاوی اسیدهای

چرب امگا سه

آنالیز داده‌های آزمایش نشان داد که تغییرات pH در نمونه‌های نانومولسیون اسانس پونه کوهی ایرانی حاوی اسیدهای چرب امگا سه را می‌توان با معادله زیر توصیف کرد.

$$pH = 6.16 - 0.071A - 0.14B + 0.28C + 0.186586D_1 - 0.115D_2 + 0.023D_3 + 0.0574AB + 0.00027AC + 0.08062BC + 0.014BD_1 - 0.013BD_2 + 0.1297BD_3 - 0.26C^2 \quad (16)$$

در معادله فوق ضرائب A, B, C, D به ترتیب نشانگر مقدار امگا سه (درصد)، مدت زمان نگهداری (روز)، درصد SOR و نوع سورفاکتانت می‌باشند. با توجه به جداول آنالیز واریانس تغییرات pH ذرات نانومولسیون، مدل نهایی دارای سطح معنی‌دار $P < 0.0001$ ، عدم برازش غیرمعنی‌دار، ضرائب تبیین و تبیین اصلاح شده به ترتیب ۰/۹۵ و ۰/۹۱۴ می‌باشند. نتایج حاصل از این تست‌ها نشان می‌دهد

Design-Expert® Software

PH

● Design Points

■ D1 SC

▲ D2 T80

◆ D3 T20

● D4 T80:20

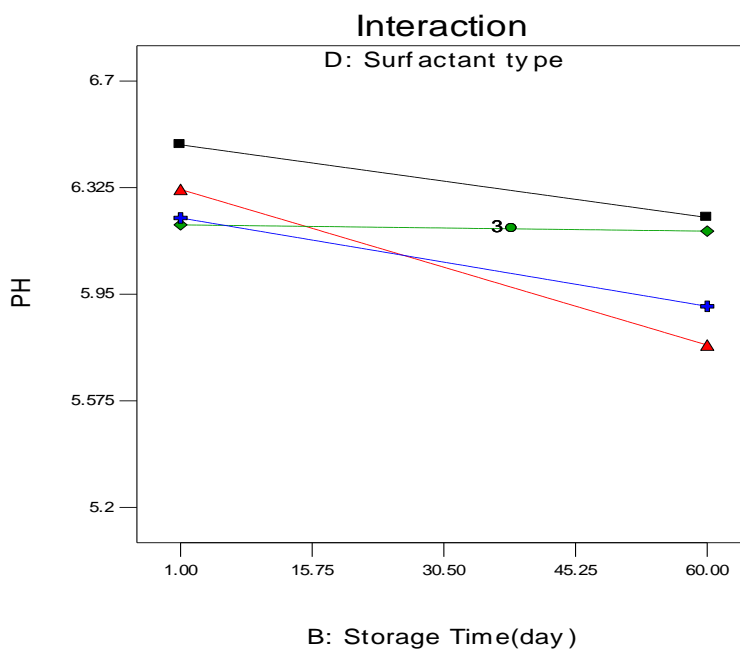
X1 = B: Storage Time(day)

X2 = D: Surfactant type

Actual Factors

A: Omega3(%) = 50.00

C: SOR(%) = 155.00



شکل ۱۸- نمودار برهمکنش تاثیر مدت زمان نگهداری و نوع سورفاکتانت بر تغییرات pH

Design-Expert® Software

PH

■ D1 SC

▲ D2 T80

◆ D3 T20

● D4 T80:20

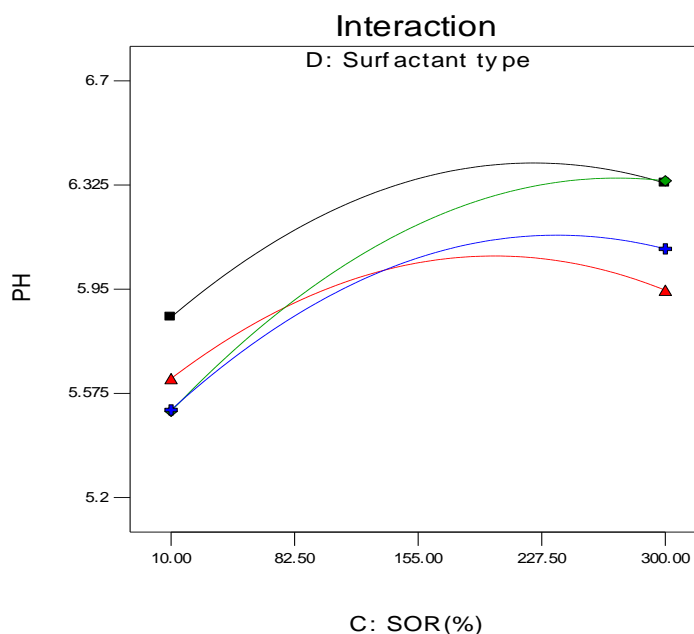
X1 = C: SOR(%)

X2 = D: Surfactant type

Actual Factors

A: Omega3(%) = 50.00

B: Storage Time(day) = 30.50



شکل ۱۹- نمودار برهمکنش تاثیر درصد SOR و نوع سورفاکتانت بر تغییرات pH

$$\begin{aligned} \text{Brix} = & 17.70 + 0.09362 A + 0.18525 B + 0.68843 C + 0.58633 D_1 + 0.15088 D_2 - 0.55044 D_3 - 0.28214 AD_1 + 0.12498 AD_2 + 0.12115 AD_3 + 0.02777 BC + 0.27089 BD_1 + 0.11906 BD_2 - 0.32213 BD_3 - 0.09111 CD_1 - 0.06747 CD_2 - 0.13784 CD_3 - 0.3679 A^2 + 0.097086 B^2 \end{aligned} \quad (17)$$

میزان بریکس نانوامولسیون‌های اسانس پونه کوهی حاوی

اسیدهای چرب امگا سه

آنالیز داده‌های آزمایش نشان داد که تغییرات بریکس در

نمونه‌های نانوامولسیون اسانس پونه کوهی حاوی اسیدهای چرب امگا

سه را می‌توان با معادله زیر توصیف کرد.

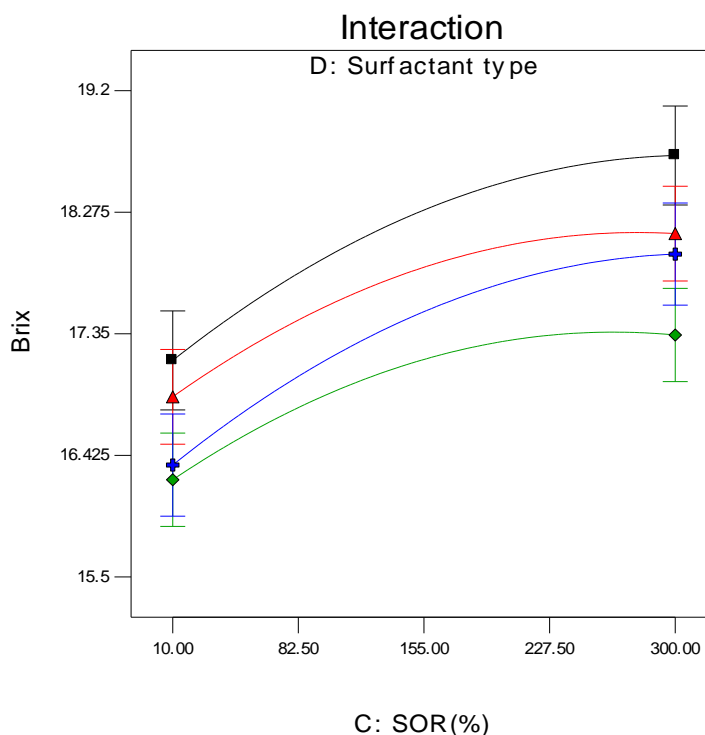
Design-Expert® Software

Brix

- D1 SC
- ▲ D2 T80
- ◆ D3 T20
- D4 T8020

X1 = C: SOR(%)
X2 = D: Surfactant type

Actual Factors
A: Omega3(%) = 50.00
B: Storage Time(day) = 30.50



شکل ۲۰- نمودار برهمکنش تاثیر درصد SOR و نوع سورفاکتانت بر تغییرات بریکس

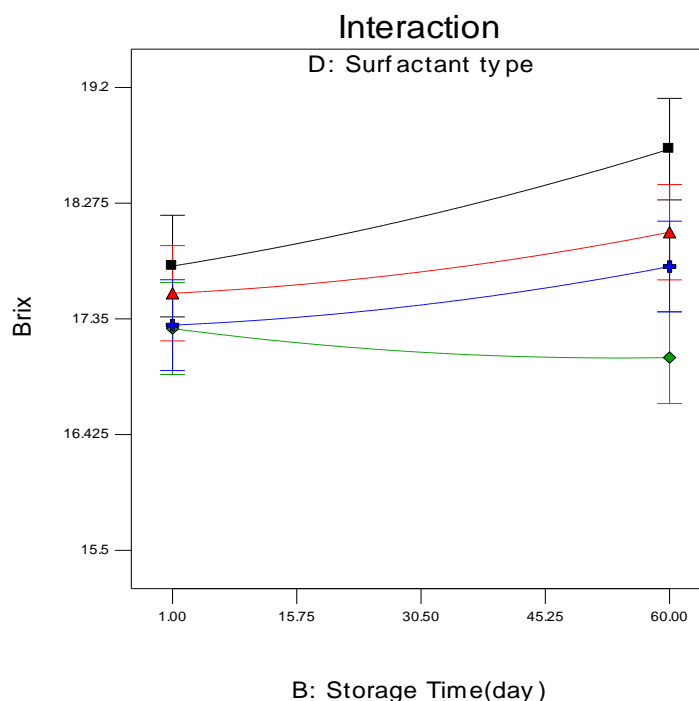
Design-Expert® Software

Brix

- D1 SC
- ▲ D2 T80
- ◆ D3 T20
- D4 T8020

X1 = B: Storage Time(day)
X2 = D: Surfactant type

Actual Factors
A: Omega3(%) = 50.00
C: SOR(%) = 155.00



شکل ۲۱- نمودار برهمکنش تاثیر مدت زمان نگهداری و نوع سورفاکتانت بر میزان تغییرات بریکس

بریکس باشد، این پروتئین گاه‌ها به‌عنوان استایلایزر در صنایع غذایی استفاده می‌گردد و این بیوپلیمر طبیعی درشت مولکول به‌دلیل ساختار منحصر به فرد و اتصال از چندین نقطه بر سطح ذرات، در طول مدت نگهداری پایدارتر بوده و با گذشت مدت زمان نگهداری امکان برقراری تعداد بیشتری از سورفاکتانت بر سطح وجود دارد همچنین برقراری پیوندهایی میان خود پروتئین‌ها و وقوع پدیده انبوهش بر افزایش میزان بریکس تاثیرگذار می‌باشد.

بهینه‌سازی اجزای تشکیل‌دهنده نانوامولسیون

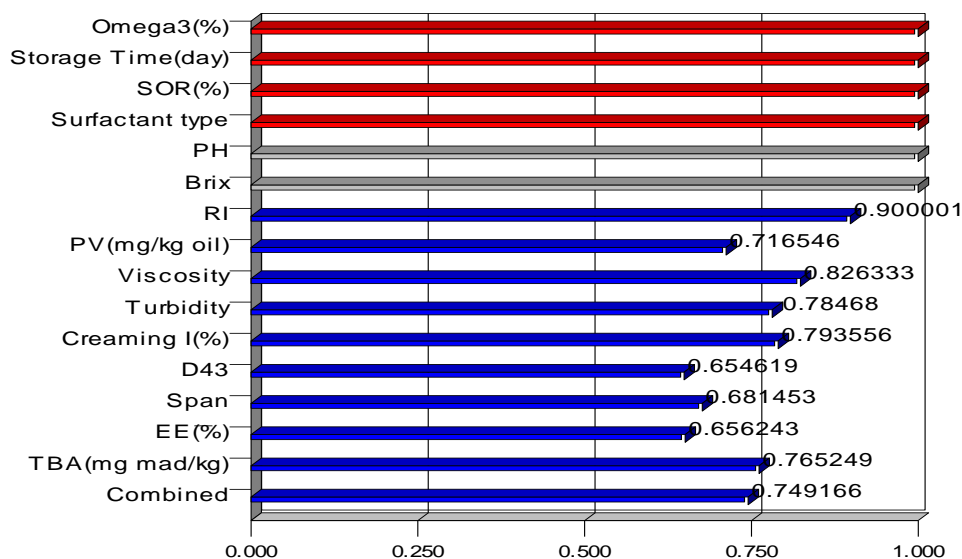
به‌منظور بهینه‌سازی پاسخ‌های موثر در تولید نانوامولسیون حاوی اسیدهای چرب امگا سه از روش تابع مطلوبیت استفاده شد. در روش تابع مطلوبیت، مطلوبیت آماری بین صفر و یک است و سطح پایین آن نشان‌دهنده عدم دستیابی به هدف مورد نظر می‌باشد و سطح بالای آن نشان‌دهنده برآورده شدن کامل هدف مورد نظر می‌باشد. وقتی هدف، بهینه‌سازی چندین پاسخ به‌طور همزمان باشد، مطلوبیت هر یک از پاسخ‌ها تعیین شده و میانگین هندسی آن‌ها به‌عنوان شاخص برآورده شدن همزمان هدف‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. شرایط بهینه برای تک تک پاسخ‌ها را نمی‌توان به‌عنوان الگوی مناسب در نظر گرفت.

در معادله فوق ضرائب A، B، C، D به‌ترتیب نشانگر مقدار امگا سه (درصد)، مدت زمان نگهداری (روز)، درصد SOR و نوع سورفاکتانت می‌باشند. با توجه به جداول آنالیز واریانس میزان بریکس ذرات نانوامولسیون، مدل نهایی دارای سطح معنی‌دار $P < 0.0001$ ، شاخص عدم برازش غیرمعنی‌دار، ضرائب تبیین و تبیین اصلاح شده به‌ترتیب 0.958 و 0.892 می‌باشند.

در تمامی انواع سورفاکتانت‌ها با افزایش درصد SOR میزان بریکس روند افزایشی داشت (شکل ۲۰). افزایش مقدار سورفاکتانت منجر به بالاتر رفتن ماده جامد نمونه‌ها گردید و در نتیجه میزان بریکس افزایش یافت، در مقادیر بالای سورفاکتانت، در نمونه‌های حاوی پروتئین کازئینات سدیم به دلیل تشکیل غشای سطحی با ضخامت بیشتر اطراف ذرات میزان بریکس بیشتر از سایر فرمولاسیون‌ها بود و نمونه‌های حاوی توئین ۸۰ به‌دلیل ساختار انعطاف‌پذیری و شاخص پکینگ بالاتر، تعداد بیشتر در ناحیه بین سطحی قرار گرفته و میزان بریکس را افزایش داد.

در فرمولاسیون‌های حاوی سورفاکتانت‌های توئین تغییرات بریکس در طول مدت زمان نگهداری معنی‌دار نبودند اما نمونه‌های حاوی پروتئین کازئینات سدیم با گذشت مدت زمان نگهداری افزایش بریکس را نشان دادند (شکل ۲۱)، در واقع افزایش جذب آب توسط سورفاکتانت‌های جذب شده و جذب نشده می‌توان علت تغییرات

Desirability



شکل ۲۴- هیستوگرام نشان‌دهنده مطلوبیت برآورده شدن هر کدام از پاسخ‌ها و مطلوبیت کلی در شرایط بهینه تولید نانوامولسیون اسانس پونه کوهی حاوی اسیدهای چرب امگا سه

نتیجه‌گیری

به‌کارگیری روش کم انرژی امولسیفیکاسیون خودبه‌خودی در این تحقیق در تولید نانوامولسیون‌های اسانس‌های گیاهی بومی پونه کوهی ایرانی حامل اسیدهای چرب امگا سه، از نظر بهبود کیفی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و افزایش ثبات آن در طول مدت زمان نگهداری روش مناسبی بود و براساس نتایج به‌دست آمده از این پژوهش نانوامولسیون امگا سه باعث پوشاندن بوی نامطلوب روغن ماهی می‌شود و غلظت امگا سه، نوع سورفاکتانت، نسبت سورفاکتانت به روغن و نوع اسانس بر روی اندازه ذرات موثر می‌باشند. اسانس‌های گیاهی بر روی بهبود ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و اکسیداتیوی نانوامولسیون‌های امگا سه تاثیرگذار بودند و نانوامولسیون‌های تهیه شده با اسانس‌های گیاهی دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشند و در کنترل میزان اکسیداسیون و محصولات حاصله موفق بودند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری مدیریت محترم شرکت آذین شوستر جناب آقای ساسان قنادان در انجام مطالعه حاضر سپاسگزاری می‌گردد.

زیرا شرایط بهینه برای یک پاسخ، ممکن است برای پاسخ دیگر شرایط نامساعدی ایجاد کند. بنابراین باید شرایطی را به‌عنوان الگوی ساخت معرفی کرد که تا حد امکان تمامی پاسخ‌ها را به نحو رضایت‌بخشی بهینه نماید به‌منظور بهینه‌سازی توام، ابتدا اهداف بهینه‌سازی مشخص گردید. یعنی پارامترهای میانگین قطر ذرات، شاخص اسپن، شاخص کدورت، اندیس خامه‌ای شدن، ضریب شکست، اندیس پراکسید و اندیس تیوباریتوریک اسید در مقادیر کمینه در نظر گرفته شدند و نتایج حاصل از بهینه‌سازی در نرم‌افزار Design Expert با استفاده از بهینه‌سازی عددی مقادیر بهینه متغیرهای مستقل نانوامولسیون‌های پونه کوهی ایرانی حامل اسیدهای چرب امگا سه به‌ترتیب، میزان امگا سه ۲۹/۳۱ درصد، مدت زمان نگهداری ۴۰ روز، درصد SOR ۱۰۰ درصد و نوع سورفاکتانت توئین ۸۰:۲۰ تعیین شدند و پاسخ‌های بهینه میانگین قطر ذرات (۱۱۵ نانومتر)، اندیس پراکسید (۲/۰۴ میلی‌اکی والان بر کیلوگرم روغن)، اندیس خامه‌ای شدن (۱/۰۶۵ درصد)، pH (۶/۰۳)، بریکس (۱۶/۱۲)، ضریب شکست (۱/۳۴)، شاخص اسپن (۰/۹۴)، اندیس تیوباریتوریک اسید (۰/۱۲) و کدورت (۰/۴۰) و با مطلوبیت ۰/۸ تخمین زده شد. میزان مطلوبیت محاسبه شده برای تک تک فاکتورها، پاسخ‌ها و نیز مطلوبیت کلی در نانوامولسیون اسانس پونه کوهی حاوی اسیدهای چرب امگا سه شکل ۲۴ نشان داده شده است

منابع

- استاندارد ملی ایران شماره ۱۰۴۹۴، روغن‌ها و چربی‌های گیاهی و حیوانی - اندازه‌گیری عدد ۲ - تیوباریتوریک اسید - به روش مستقیم.
- استاندارد ملی ایران شماره ۴۱۷۹، اندازه‌گیری عدد پراکسید در روغن‌ها و چربی‌های خوراکی.
- مساح، م، ۱۳۹۲. بررسی ویژگی‌های کلئیدی نانوامولسیون‌های حاوی آلفاتوکوفرول تولید شده با استفاده از روش کم انرژی بر پایه سورفاکتانت. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.
- نیک‌نیا، ن؛ قنبرزاده، ب؛ همیشه‌کار، ح؛ رضایی‌مکرم، ر، ۱۳۹۲. تهیه و ارزیابی نانوامولسیون‌های خوراکی ویتامین E با روش خودبه‌خودی. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، ۸، ۶۵-۵۱.
- وثوق، ا؛ خمیری، م؛ کاشانی‌نژاد، م؛ جعفری، م، ۱۳۸۸. ماندگاری بیفیدوباکتریوم لاکتیس و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در دوغ حاوی عصاره کاکوتی. مجله علوم و صنایع غذایی ایران، دوره ۶، شماره ۲۳، ۷۷-۸۵.
- Al-bayati, F. A. 2009. Isolation and identification of antimicrobial compound from *Mentha longifolia* L. leaves grown wild in Iraq. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 8, 20.
- Alzorqi, I., Ketabchi, M. R., Sudheer, S. and Manickam, S. 2016. Optimization of ultrasound induced emulsification on the formulation of palm-olein based nanoemulsions for the incorporation of antioxidant β -d-glucan polysaccharides. *Ultrasonics Sonochemistry*, 31, 71-84.
- Anandan, C., Nurmatov, U. and Sheikh, A. 2009. Omega 3 and 6 oils for primary prevention of allergic disease: systematic review and meta-analysis. *Allergy*, 64, 840-848.
- Ahn, J.-H., Kim, Y. P., Seo, E. M., Choi, Y. K. and Kim, H.S. 2008. Antioxidant effect of natural plant extracts on the microencapsulated high oleic sunflower oil. *Journal of Food Engineering*, 84, 327-334.
- Anand Rao, W. P. 2014. Process Optimization for the preparation of Micro/Nanoemulsion of Curcumin Using High speed Homogenizer. *NDRI, Karnal*.
- Berton, C., Ropers, M. H., Bertrand, D., Viau, M., and Genot, C. 2012. Oxidative stability of oil-in-water emulsions stabilised with protein or surfactant emulsifiers in various oxidation conditions. *Food Chemistry*, 131(4), 1360-1369.

- Chanda, H., Das, P., Chakraborty, R., and Ghosh, A. 2011. Development and evaluation of liposomes of fluconazole. *J Pharm Biomed Sci*, 5(27), 1-9.
- Chen, H., Guan, Y., and Zhong, Q. 2015. Microemulsions based on a sunflower lecithin-Tween 20 blend have high capacity for dissolving peppermint oil and stabilizing coenzyme Q10. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63(3), 983-989.
- Cheng, Y., Xiong, Y. L., and Chen, J. 2011. Antioxidant and emulsifying properties of potato protein hydrolysate in soybean oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, 120(1), 101-108.
- Cheong, A. M., Tan, K. W., Tan, C. P., and Nyam, K. L. 2016. Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) seed oil-in-water Pickering nanoemulsions stabilised by mixture of sodium caseinate, Tween 20 and β -cyclodextrin. *Food Hydrocolloids*, 52, 934-941.
- Chiesa, M., Garg, J., Kang, Y. T., and Chen, G. 2008. Thermal conductivity and viscosity of water-in-oil nanoemulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 326(1-2), 67-72.
- Dickinson, E., Golding, M., and Povey, M. J. 1997. Creaming and flocculation of oil-in-water emulsions containing sodium caseinate. *Journal of colloid and interface science*, 185(2), 515-529.
- Dłużewska, E., Stabiecka, A., and Maszewska, M. 2006. Effect of oil phase concentration on rheological properties and stability of beverage emulsion. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 5(2), 147-156.
- Donnelly, J. L., Decker, E. A., and McClements, D. J. 1998. Iron-Catalyzed Oxidation of Menhaden Oil as Affected by Emulsifiers. *Journal of Food Science*, 63(6), 997-1000.
- Esfanjani, A., Jafari, S.M., Assadpour, E. 2017. Preparation of a multiple emulsion based on pectin-whey protein complex for encapsulation of saffron extract nanodroplets. *Food Chemistry*, 221, 1962-1969.
- Faraji, N., Pirs, S., Alizadeh, M. and Almasi, H. 2018. Optimizing Production of Mentha longifolia Essential Oil Emulsion Loaded with Omega 3 Fatty Acids by Nano-Fiber/Gas Chromatography. *Journal of Bioanalysis & Biomedicine*, 10(1)-30-39.
- Freeman, M. P., Hibbeln, J. R., Wisner, K. L., Davis, J. M., Mischoulon, D., Peet, M., and Stoll, A. L. 2006. Omega-3 fatty acids: evidence basis for treatment and future research in psychiatry. *Journal of Clinical psychiatry*, 67(12), 1954.
- Gadkari, P. V., and Balaraman, M. 2015. Extraction of catechins from decaffeinated green tea for development of nanoemulsion using palm oil and sunflower oil based lipid carrier systems. *Journal of Food Engineering*, 147, 14-23.
- Ganesan, B., Brothersen, C., and McMahon, D. J. (2014). Fortification of foods with omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Critical reviews in food science and nutrition*, 54(1), 98-114.
- Ghosh, V., Mukherjee, A., and Chandrasekaran, N. 2014. Eugenol-loaded antimicrobial nanoemulsion preserves fruit juice against microbial spoilage. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 114, 392-397.
- Gulotta, A., Saberi, A. H., Nicoli, M. C., and McClements, D. J. 2014. Nanoemulsion-based delivery systems for polyunsaturated (ω -3) oils: formation using a spontaneous emulsification method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(7), 1720-1725.
- Hu, Q., Gerhard, H., Upadhyaya, I., Venkitanarayanan, K., and Luo, Y. 2016. Antimicrobial eugenol nanoemulsion prepared by gum arabic and lecithin and evaluation of drying technologies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 87, 130-140.
- Jafari, S. M., Assadpour, E., He, Y., and Bhandari, B. 2008. Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying. *Drying Technology*, 26(7), 816-835.
- Jafari, S. M., He, Y., and Bhandari, B. 2007. Encapsulation of nanoparticles of d-limonene by spray drying: role of emulsifiers and emulsifying techniques. *Drying Technology*, 25(6), 1069-1079.
- Lavie, C. J., Milani, R. V., Mehra, M. R., and Ventura, H. O. 2009. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cardiovascular diseases. *Journal of the American College of Cardiology*, 54(7), 585-594.
- Lee, S. J., Choi, S. J., Li, Y., Decker, E. A., and McClements, D. J. 2010. Protein-stabilized nanoemulsions and emulsions: comparison of physicochemical stability, lipid oxidation, and lipase digestibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(1), 415-427.
- Li, J., Solval, K. M., Alfaro, L., Zhang, J., Chotiko, A., Delgado, J. L. B., and Sathivel, S. 2015. Effect of blueberry extract from blueberry pomace on the microencapsulated fish oil. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(2), 199-206.
- Lim, H. K., Tan, C. P., Bakar, J., and Ng, S. P. 2012. Effects of different wall materials on the physicochemical properties and oxidative stability of spray-dried microencapsulated red-fleshed pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) seed oil. *Food and Bioprocess Technology*, 5(4), 1220-1227.
- Maki, K. C., Yurko-Mauro, K., Dicklin, M. R., Schild, A. L., and Geohas, J. G. 2014. A new, microalgal DHA-and EPA-containing oil lowers triacylglycerols in adults with mild-to-moderate hypertriglyceridemia. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 91(4), 141-148.
- Mancuso, J. R., McClements, D. J., and Decker, E. A. 1999. The effects of surfactant type, pH, and chelators on the oxidation of salmon oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 4112-4116.

- Mancuso, J. R., McClements, D. J., and Decker, E. A. 2000. Iron-accelerated cumene hydroperoxide decomposition in hexadecane and trilaurin emulsions. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(2), 213-219.
- Martín-Diana, A. B., Rico, D., Barat, J. M., and Barry-Ryan, C. 2009. Orange juices enriched with chitosan: Optimisation for extending the shelf-life. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10(4), 590-600.
- McClements, D. J. 2014. Nanoparticle-and microparticle-based delivery systems: Encapsulation, protection and release of active compounds. *CRC Press*.
- McClements, D. J. 2015. Food emulsions: principles, practices, and techniques. *CRC press*.
- McClements, D. J., Decker, E. A., and Weiss, J. 2007. Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. *Journal of Food Science*, 72(8).
- McClements, D. J., Decker, E. A., and Weiss, J. 2007. Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. *Journal of Food Science*, 72(8).
- Méx, B. S. Q. 2008. Emulsifying properties of proteins.
- Meyer, B. J., Mann, N. J., Lewis, J. L., Milligan, G. C., Sinclair, A. J., and Howe, P. R. 2003. Dietary intakes and food sources of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Lipids*, 38(4), 391-398.
- Mohammadi, A., Jafari, S. M., Esfanjani, A. F., and Akhavan, S. 2016. Application of nano-encapsulated olive leaf extract in controlling the oxidative stability of soybean oil. *Food chemistry*, 190, 513-519.
- Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol*, 26(2), 211-219.
- Nakaya, K., Ushio, H., Matsukawa, S., Shimizu, M., and Ohshima, T. 2005. Effects of droplet size on the oxidative stability of oil-in-water emulsions. *Lipids*, 40(5), 501-507.
- Nuchi, C. D., Hernandez, P., McClements, D. J., and Decker, E. A. 2002. Ability of lipid hydroperoxides to partition into surfactant micelles and alter lipid oxidation rates in emulsions. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(19), 5445-5449.
- Nuchi, C. D., McClements, D. J., and Decker, E. A. 2001. Impact of Tween 20 hydroperoxides and iron on the oxidation of methyl linoleate and salmon oil dispersions. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(10), 4912-4916.
- Rao, J., and McClements, D. J. 2012. Food-grade microemulsions and nanoemulsions: Role of oil phase composition on formation and stability. *Food hydrocolloids*, 29(2), 326-334.
- Ribeiro, R. C. D. A., Barreto, S. M. A. G., Ostrosky, E. A., Rocha-Filho, P. A. D., Veríssimo, L. M., and Ferrari, M. (2015). Production and characterization of cosmetic nanoemulsions containing *Opuntia ficus-indica* (L.) mill extract as moisturizing agent. *Molecules*, 20(2), 2492-2509.
- Saarela, M., Lähteenmäki, L., Crittenden, R., Salminen, S., and Mattila-Sandholm, T. 2002. Gut bacteria and health foods—the European perspective. *International journal of food microbiology*, 78(1-2), 99-117.
- Saberi, A. H., Fang, Y., and McClements, D. J. 2013. Effect of glycerol on formation, stability, and properties of vitamin-E enriched nanoemulsions produced using spontaneous emulsification. *Journal of colloid and interface science*, 411, 105-113.
- Saberi, A. H., Fang, Y., and 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.
- Saberi, A. H., Fang, Y., and McClements, D. J. 2014. Stabilization of vitamin E-enriched mini-emulsions: Influence of organic and aqueous phase compositions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 449, 65-73.
- Silva, H. D., Cerqueira, M. A., and Vicente, A. A. 2015. Influence of surfactant and processing conditions in the stability of oil-in-water nanoemulsions. *Journal of Food Engineering*, 167, 89-98.
- Tan, T. B., Yussof, N. S., Abas, F., Mirhosseini, H., Nehdi, I. A., and Tan, C. P. 2016. Forming a lutein nanodispersion via solvent displacement method: the effects of processing parameters and emulsifiers with different stabilizing mechanisms. *Food chemistry*, 194, 416-423.
- Topuz, O. K., Özvural, E. B., Zhao, Q., Huang, Q., Chikindas, M., and Gölükçü, M. 2016. Physical and antimicrobial properties of anise oil loaded nanoemulsions on the survival of foodborne pathogens. *Food chemistry*, 203, 117-123.
- Valero, M., and Frances, E. 2006. Synergistic bactericidal effect of carvacrol, cinnamaldehyde or thymol and refrigeration to inhibit *Bacillus cereus* in carrot broth. *Food Microbiology*, 23(1), 68-73.
- Venkadesaperumal, G., Rucha, S., Sundar, K., and Shetty, P. H. 2016. Anti-quorum sensing activity of spice oil nanoemulsions against food borne pathogens. *LWT-Food Science and Technology*, 66, 225-231.
- Walker, R., Decker, E. A., and McClements, D. J. 2015. Development of food-grade nanoemulsions and emulsions for delivery of omega-3 fatty acids: opportunities and obstacles in the food industry. *Food and Function*, 6(1), 41-54.
- Xia, S., and Xu, S. 2005. Ferrous sulfate liposomes: preparation, stability and application in fluid milk. *Food research international*, 38(3), 289-296.
- Zhang, Y., Tan, C., Abbas, S., Eric, K., Zhang, X., Xia, S., and Jia, C. 2014. The effect of soy protein structural modification on emulsion properties and oxidative stability of fish oil microcapsules. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 120, 63-70.

Zhong, J., Yang, R., Cao, X., Liu, X., and Qin, X. 2018. Improved Physicochemical Properties of Yogurt Fortified with Fish Oil/ γ -Oryzanol by Nanoemulsion Technology. *Molecules*, 23(1), 56.

Optimization of *Iranian mentha longifolia* of nanoemulsion containing omega-3 fatty acids by Spontaneous emulsification

N. Faraji¹, M. Alizadeh^{2*}, H. Almasi³, S. Pirsai³, S. Faraji⁴

Received: 2019.12.19

Accepted: 2020.04.18

Introduction: Fish oil is an omega3 source, because it consists of a long chain polyunsaturated fatty acids (PUFAs), namely Eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5 n-3) and Docosahexaenoic acid (DHA, 22:6 n-3) that are essential to all humans and provide multiple health benefits associated with brain development, cardiovascular disease, circulatory disorders, immune dysfunction and inflammatory disorders. The human body cannot make omega3 fatty acids on its own, so they must be obtained from daily diet or supplements. Low uptake of this nutrient can cause serious problems. Lipid oxidation of fish oil and other PUFA-rich foods is a serious problem that leads to loss of shelf-life, consumer acceptability, nutritional value and functionality. On the other hand, omega3 cannot be incorporated into many functional foods, due to their poor water-solubility, chemical instability and low bioavailability, so some ways should be used to protect PUFAs such as microencapsulation and Nanoemulsion. The performance of low-energy methods has become very popular due to the lack of expensive equipments and ease of production. In this research, nanoemulsion of omega-3 fatty acids was prepared by spontaneous emulsification method using Iranian mentha longifolia essential oils.

Material and methods: Fish oil was purchased from zahravi company comprised of 101 mg of EPA/g of oil, 148 mg of DHA/g oil, and 312 mg of total omega-3 PUFA/g of oil. Nonionic surfactants Tween 80 and Tween20 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) and Sodium caseinate (MP Biomedical LLC. (Solon, OH) were purchased from chemical suppliers. Distilled and deionized water obtained from a water purification system (Milli-Q, Millipore, Darmstadt, Germany) was used to prepare all emulsions. All other chemicals used in this study were either Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) or Fisher Scientific (Pittsburgh, PA). Iranian Shallot oil (penny royal oil) was purchased from magnolia company (Iran). The supplier reported the chemical composition as determined by gas chromatography-mass spectroscopy instrument (GCMS-QP2010 SE, GAS, Shimadzu, Japan). Factor A contains the omega 3 percent (25 to 75 percent), factor B contains surfactant-to-oil ratio (SOR %), (10-300 percent), Factor c contains surfactant type (Tween20, Tween80, T80:T20 and caseinate sodium) and factor d contains storage time (1-60 days) to achieve optimal production formula were selected. Physicochemical characteristics of Nanoemulsion including pH, peroxide value, turbidity, creaming index, D₄₃, span, antioxidant, brix, refractive index and TBA were studied and Optimization of formula was performed by Response Surface Method (D-optimal design) The results were analyzed using design expert software (ver11).

Results and discussion: Preparation of Nanoemulsion based on Iranian mentha longifolia oil loaded with omega 3 fatty acids by a low energy emulsification technique to protect it was evaluated in this study. The initial size of the droplets depended on surfactant type, surfactant concentration, storage time and omega3 concentration. Emulsions made of the highest surfactant concentration produced the smallest droplet sizes and were physically stable. It was found that the most important parameter effecting final emulsion responses was surfactant concentration. Our results showed that oxidative stability could be improved by the increasing surfactant concentration, also Iranian mentha longifolia antioxidant compounds were effective in reducing peroxide index and delaying oxidation. In all surfactants, by increase omega3 content, antioxidant activity was decreased. Results showed that all four examined variables affected the provided emulsion characteristics and the following conditions were obtained as optimum; storage time of 40 days, SOR %: 100, T80:T20 and omega 3 (29.31%). These nanoemulsions and essential oils can be applied to prevent undesirable off flavor fish oil and can be applied to fortify food or beverage systems with omega3 fatty acids.

Key words: Nanoemulsion –Unsaturated fatty acids- Omega 3 –Spontaneous emulsification – *Iranian Mentha longifolia* Essential Oil

1. PhD. graduated in Food science and technology, R&D manager at Azin Company.

2, 3. Professor and Associate professor, Food science and technology department, Urmia University.

4. MSc in Food science and technology, QC manager at Azin Company.

(*Corresponding Author Email: m.alizadeh@urmia.ac.ir)