

Preparing Pickering Emulsion of Canthaxanthin and Stabilization with Cellulose Nanocrystals

SHEIDA HEDJAZI¹, SEYED HADI RAZAVI^{2*}, MOAZAMEH KORDJAZI³, FARAMARZ KHODAEYAN⁴

1. Former Graduated Student, Department of Food Science and Engineering, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.
2. Professor, Department of Food Science and Engineering, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.
3. Assistant Professor, Department of Fisheries, College of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
4. Associate Professor, Department of Food Science and Engineering, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

(Received: May. 15, 2018- Revised: Aug. 18, 2018- Accepted: Sep. 23, 2018)

ABSTRACT

The aim of this study was to prepare an ultra-stable emulsion for canthaxanthin with cellulose nanocrystals and investigating its physiochemical properties. Canthaxanthin used in this study was a metabolite of *Dietzia natronolimnaea* HS-1. Cellulosic nanocrystals (CNCs) of cotton linter were made and characterized using acid hydrolysis. Dynamic light scattering (DLS) alongside Atomic Force Microscopy (AFM) represented needle-like particles with length of 212 ± 11 and thickness of 5 ± 2 . The crystallinity degree of CNC for cotton linter increased from (76.4%) to (86.6%). FTIR (ATR) spectroscopy suggested more surface hydroxyl groups for CNCs than native cellulose and complete digestion of hemicelluloses by acid. Pickering emulsions of oil in water were prepared using an ultrasonic homogenizer. The results of the morphological tests indicated a sample with the same particle dispersion. Results indicated that generated emulsions represent promising stability in different environmental conditions for a long period of time.

Keywords: Acidic Hydrolysis, Canthaxanthin, Pickering emulsion, Cellulose nanocrystal

تهیه امولسیون پیکرینگ از کانتازانتین و پایدارسازی آن توسط نانوکریستال سلولز

شیدا حجازی^۱، سید هادی رضوی^{۲*}، معظمه کردجزی^۳، فرامرز خدائیان^۴

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران،

کرج، ایران

۲. استاد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

۳. استادیار، گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۴. دانشیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۲/۲۵ - تاریخ بازنگری: ۱۳۹۷/۵/۲۷ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۷/۱)

چکیده

هدف از این تحقیق تهیه امولسیون فوق پایدار برای کانتازانتین با نانوکریستال سلولز و بررسی صفات فیزیکی و شیمیایی آن بود. کانتازانتین استفاده شده در این تحقیق متابولیت باکتری *Dietzia natronolimnaea HS-1* بود. نانوذرات سلولز از الیاف کتان با روش هیدرولیز اسیدی تهیه گردید. نتایج پراکندگی نور دینامیک، میکروسکوپ نیروی اتمی نشان داد که طول ذرات 11 ± 112 و قطر 2 ± 5 نانومتر بود. بلورینگی ذرات پس از هیدرولیز از $4/76$ برای الیاف کتان به $6/86$ درصد رسید. نتایج آزمون اسپکتروسکوپی فوریه (ATR) نشان داد گروه های هیدروکسیل سطحی نانوکریستال نسبت به سلولز بیشتر بوده و هضم کامل همی سلولز توسط اسید صورت گرفت. امولسیون های پیکرینگ روغن در آب با استفاده از هموژنایزر اولتراسونیک تهیه شدند. نتایج آزمون های ریخت شناسی بیانگر نمونه ای با پراکندگی ذرات یکسان بود. امولسیون ها در شرایط محیطی پایدار بسیار خوبی از خود برای مدت زمان طولانی نشان دادند.

واژه های کلیدی: هیدرولیز اسیدی، کانتازانتین، پیکرینگ امولسیون، نانوکریستال سلولز

مقدمه

امولسیون ها سامانه های ناهمگن^۱ حاوی قطرات مایع دیسپرس شده در یک مایع غیر قابل امتزاج دیگر می باشند که امروزه به طور گسترده ای در مواد آرایشی، غذا، دارو و ... مورد استفاده قرار می گیرند. نکته ی مهم در ارتباط با امولسیون ها، پایداری آنهاست که برای حفظ ویژگی های امولسیون با گذشت زمان ضروری می باشد. سورفکتانت های مصنوعی و پلی مرهای دارای فعالیت در سطح که در لایه بین سطحی جذب شده و سبب کاهش کشش بین سطحی می شوند به عنوان امولسیفایر برای ساخت امولسیون پایدار مورد استفاده قرار می گیرند (Chen et al., 2011).

به علت اثرات مضر برخی امولسیفایرها مانند نگرانی از ایمن بودن برخی از آنها به ویژه انواع سنتزی، به دام افتادن هوا، کف کردن و... ساخت امولسیون بدون استفاده از امولسیفایر، توجه زیادی را به خود جلب کرده است. در حال حاضر، یک روند بسیار قوی در بازار نسبت به فرمولاسیون

محصولات وجود دارد که نه تنها محصول باید خوراکی باشد بلکه

باید نظر مصرف

کننده را به عنوان یک محصول طبیعی و غیر سنتزی جلب کند. این مسائل سبب تولید و جداسازی ذرات بدست آمده از مواد زیستی برای فرمولاسیون امولسیون در صنایع غذایی و آرایشی شده است (Rayner et al., 2014). با توجه به مقررات جدید، مقدار قابل توجهی از تلاش های مداوم تولید کنندگان برای کاهش سورفکتانت، به ویژه کاهش سورفکتانت های سنتزی با جایگزین های بیولوژیکی و سازگار با محیط صورت می گیرد (Rayner et al., 2014).

یک راه برای این منظور، جانشین سازی امولسیفایر با ذرات جامد است. امولسیون های پایدار شده با ذرات جامد، امولسیون پیکرینگ نامیده می شوند. جذب ذرات در سطح بین آب و روغن، به میزان ترشدگی^۲ نسبی آنها به وسیله آب و روغن بستگی دارد. در صورت تر شدن با آب، زاویه تماس^۳ کمتر از ۹۰ درجه بوده و امولسیون روغن در آب به دست می آید و در

2. Wetting

3. Contact angle

* نویسنده مسئول: Srazavi@ut.ac.ir

1. Heterogeneous

ذرات جامد میله‌ای شکل که از توده‌های زیستی^۵ گرفته می‌شوند مورد توجه بسیاری از محققان واقع شده‌اند. این ذرات مزایایی همچون پایدار کردن سطح مشترک روغن و آب و همچنین دوستدار محیط زیست بودن را دارند که در نتیجه از آن‌ها در کاربردهای وسیعی استفاده می‌شود. در بین ماکرومولکول‌های زیستی، سلولز یک همپولی‌مر خطی از $\beta(1\rightarrow4)$ -گلوکز می‌باشد که یک ساختار نیمه کریستالی را می‌سازد که در آن قسمت‌های فوق منظم (کریستالی) توسط محورهای میکروفیبریلی بی‌نظم (فاز آمورف) جدا شده‌اند. گزارشات زیادی در مورد مواد فیبری سلولزی یا سلولز میکروفیبریل شده‌ی آبدوست که توانایی پایدار کردن امولسیون‌های روغن در آب را داشتند وجود دارد. اگرچه فیبرها مشکل‌هایی همچون: توده‌ای شدن^۶، آلودگی داشتن، عدم توانایی در کنترل اندازه این ذرات در طول تولید (که منجر به نداشتن کنترل روی مشخصات امولسیون مثل اندازه قطرات، صفات ویسکومتری و تهیه مجدد می‌شود) را دارند. تنها، ذرات کوچک توانایی داشتن شرایط تحت کنترل را دارند. ذرات به شدت کریستالی که مورفولوژی متنوعی دارند توسط هیدرولیز اسیدی قابل تهیه هستند. شیمی سطح این ذرات به منبع سلولزی اولیه و شرایط هیدرولیز اسیدی همچون: غلظت اسید، زمان واکنش، دما و خلوص مواد بستگی دارد. به علت آبدوست بودن و تنها در کنارها آب‌گریز بودن، سلولز اصلاح نشده تنها توانایی پایدارسازی امولسیون‌های روغن در آب را دارد. برای تهیه امولسیون‌های آب در روغن نیاز به اصلاح سطحی سلولز به سمت آبگریزی می‌باشد. (Kalashnikova et al., 2013)

کریستال‌های سلولزی دارای اندازه مقطعی حدود ۵ الی ۲۵ نانومتر و طول‌های متفاوت وابسته به منبع سلولزی می‌باشند که از نانومتر تا میکرومتر متغیر می‌باشند. در نتیجه نانوکریستال‌های سلولزی کاندیداهای مناسبی برای پایدارسازی سطح مشترک می‌باشند (Kalashnikova et al., 2013).

کارائوتوئیدها گروه گسترده‌ای از رنگ‌دانه‌ها می‌باشند که دارای گروه‌های ایزوپرن غیراشباع می‌باشند (Chandi & Gill, 2011). این رنگ‌دانه‌ها در تمام ارگانسیم‌های فتوسنتز کننده همچون گیاهان، جلبک‌ها و بعضی از باکتری‌ها و جلبک‌های غیر فتوسنتز کننده حضور دارند (Ghatibzahedi & et al., 2013). استخراج باکتریایی این رنگ‌دانه نسبت به استخراج آن از منابع دیگر مزایای زیادی دارد، همچون عدم وابستگی استخراج

زاویه تماس بزرگتر از ۹۰ درجه نوع امولسیون آب در روغن خواهد بود (Ferlichowska et al., 2010). در امولسیون‌های پیکرینگ^۱ ذرات روی سطح مشترک آب و روغن انباشته شده و سد مکانیکی (استری) ایجاد می‌کنند که از درهم‌آمیختگی^۲ قطرات امولسیون جلوگیری می‌کند. میزان این جلوگیری به تراکم ذرات انباشته شده در سطح مشترک و انرژی لازم برای جدا کردن ذرات بستگی دارد (Dickinson et al., 2012). امولسیون‌های پیکرینگ عاری از سورفکتانت به دلیل ویژگی‌های خاص خود، روزبه‌روز توجه بیشتری را به خود جلب می‌کنند. پایداری بیشتر امولسیون‌های پیکرینگ در برابر درهم‌آمیختگی قطرات و رسیدگی استوالد^۳ سبب محافظت از قطرات در غلظت بالای فاز پراکنده می‌شود (Chen et al., 2011). انواع مختلف ذرات برای پایدارسازی امولسیون‌های پیکرینگ مورد استفاده قرار گرفته‌اند که از جمله‌ی آنها: ذرات غیر خوراکی سیلیکا و رس (Chen et al., 2011)، ذرات نشاسته (Marku et al., 2012)، نانوکریستال‌های کیتین (Tan et al., 2012)، فیبرهای سلولزی (Zoppe et al., 2012)، نانوذرات کیتوزان (Wei et al., 2012)، میکروژل‌های پروتئین آب پنیر (Destribats et al., 2014)، نانوکریستال سلولزی (Tasset et al., 2013; Kalashnikova et al., 2013; Capron et al., 2013)، مثال‌هایی از کاربرد ذرات زیستی^۴ در آماده‌سازی و پایداری امولسیون‌های پیکرینگ می‌باشند.

برخلاف پتانسیل بالا، کاربرد امولسیون پیکرینگ در صنعت غذا به علت عدم حضور ذرات پایدارکننده‌ی دارای درجه خوراکی بسیار محدود است. به همین دلیل در سال‌های اخیر تلاش محققان در جهت رسیدن به این هدف بسیار افزایش یافته است (Kargar et al., 2012). یکی از کاربردهای امولسیون‌های پایدار شده با ذرات، بهبود پایداری اکسیداتیو روغن می‌باشد. مطالعات (Kargar et al., 2012) نشان داد که استفاده از میکروکریستال‌های سلولز و نشاسته اصلاح شده برای تهیه امولسیون، سبب کاهش سرعت اکسیداسیون روغن می‌شود که ناشی از تشکیل لایه‌ی ضخیم در اطراف قطرات روغن است.

مطالعات زیادی برای فهم چگونگی فرایند واکنشی که در جذب ذرات در سطح مشترک دخیل هستند انجام گرفته شده و یکی از فاکتورهای مهم و اساسی در پایداری این امولسیون‌ها اندازه و شکل ذرات می‌باشد.

1. Pickering Emulsions
2. Coalescence
3. Ostwald ripening
4. Bio-particles

5. Biomass
6. Aggregation

به فصل یا مکان جغرافیایی، همچنین طبیعی بودن آن در مقایسه با کارتنوئید های سنتزی از مزایای استفاده از کارتنوئید باکتریایی می باشد (Gharibzahedi & et al., 2014). کانتازانتین یک کتوکارتنوئید با خاصیت آنتی اکسیدانی قوی می باشد. طیف رنگی آن شامل نارنجی تا قرمز می شود. این رنگدانه علاوه بر جاذبه ظاهری، دارای خواص سلامتی بخشی می باشد که امروزه در بازار تقاضا بسیار مورد توجه است که در نتیجه این رنگدانه را به یک رنگدانه مفید برای صنایع دارویی و غذایی تبدیل کرده است (Gharibzahedi & et al., 2013). در بین منابع مختلف بیولوژیکی تولید کانتازانتین با باکتری *Dietzia natronolimnaea HSI* تولیدی امیدوارکننده و قابل قبول دارد (Khodaiyan & et al., 2007).

$$TC (\mu g/l) = \frac{A_{474} \times V_s \times 10^9}{A_{1cm}^{1\%} \times 100} \quad (\text{رابطه ۱})$$

که در آن A_{474} حداکثر جذب کارتنوئید در اتانول، V_s حجم نمونه، $A_{1cm}^{1\%}$ ضریب جذب مخصوص برای کارتنوئید کل در محلول یک درصد در سلول یک سانتی متری در متانول می باشد ($A_{1cm}^{1\%} = 2200$).

در نهایت استخراج ها با استفاده از روش اصلاح شده که توسط Razavi, Blanchard, & Marc سال ۲۰۰۶ ارائه دادند با استفاده از دستگاه HPLC با ستون سلیکا ۱۸-PR ۱۰۰ میکروسفر (۵mm، ۲۵۰ mm، ۴ mm) در دمای ۳۵ درجه آنالیز شدند.

تولید نانوکریستال سلولزی

کریستال های سلولزی طی هیدرولیز اسیدی به دست آمدند. برای تولید نانوکریستال سلولزی، ۱۱/۴۳ گرم الیاف پنبه توسط ۱۰۰ میلی لیتر سولفوریک اسید ۶۴٪ در دمای ۷۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه در حمام پاستور با دور همزنی ۴۰۰ دور در دقیقه هیدرولیز شد (Ultrasonic processor XL, 2020, Misonix). سپس در ۱۰۰۰۰ برابر شتاب گرانش زمین به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ صورت گرفت و ته نشست مجدداً با آب مقطر شستشو داده شد و سانتریفوژ مجدد انجام گرفت. این مرحله تا جایی که روشناور کدر شود تکرار می شود (Bondeson et al., 2006). روشناور حاصل جمع آوری گردید و به کیسه های دیالیز (Sigma Aldrich Co. USA) برای رسیدن به pH خنثی منتقل شد. کیسه های دیالیز در برابر آب مقطر به مدت ۷ روز نگهداری شدند. آب مخزن نگهداری کیسه ها هر ۱۲ ساعت توسط pH متر اندازه گیری می شد تا تغییرات pH مورد بررسی قرار گیرد. این رویه تا زمانی که pH حالت پایدار پیدا کند ادامه یافت. سپس سوسپانسیون نهایی در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد.

در این تحقیق هدف تهیه یک سیستم امولسیون جدید برای اولین بار برای کانتازانتین بود. این سیستم اولسیونی برای اولین بار برای این رنگدانه مورد بررسی قرار گرفت. نانوذرات سلولز از الیاف کتان توسط هیدرولیز با سولفوریک اسید تهیه شدند. امولسیون های روغن در آب با موفقیت توسط سونیکاسیون تهیه شدند. دستگاه پراکندگی نور لیزر و میکروسکوپ نوری ساختار و اندازه ذرات امولسیون را بررسی کرد و امولسیون هایی با پراکندگی ذرات یکسان حاصل شد.

مواد و روش ها

مواد

الیاف کتان از Peter Temming AG تهیه شدند. اسید سولفوریک با خلوص ۹۵٪ از شرکت Merck آلمان تهیه شد. روغن نارگیل از فروشگاه محلی تهیه گردید. از این روغن به علت دارا بودن اسیدهای چرب اشباعی زیادش، که منجر به کمتر شدن مشکل اکسیداسیون می شود، استفاده شد. باقی مواد با درجه آزمایشگاهی از شرکت Merck تهیه شدند.

روش ها

استخراج و آنالیز کانتازانتین

باکتری *Dietzia natronolimnaea HSI* استفاده شده در این تحقیق از آزمایشگاه مهندسی زیست فناوری دانشگاه تهران تهیه شد. تولید و استخراج رنگدانه ها با استفاده از روش (Gharibzahedi et al., 2013)، انجام پذیرفت. بلافاصله پس از تولید در محیط اولیه^۱ به ارلن حاوی ملاس چغندر (۲۵ g/L) و ۱۰g مخمر اضافه شد و در انکوباتور با دور ۱۸۰ بر دقیقه، دمای

1. Pre-culture

اسلاید تهیه شده خشک گردید. عکس‌ها از روی این نمونه گرفته شدند.

تهیه امولسیون اولیه

برای تهیه امولسیون پیکرینگ اولیه درصدهای مختلف از سوسپانسیون نانوسلولز ساخته شد (۰/۳ - ۰/۶ - ۰/۹ w/w) ساخته شد. سپس به این سوسپانسیون ۲۰٪ از حجم نهایی روغن افزوده گشت. بعد از هم زنی اولیه با دستگاه ورتکس، نمونه‌ها سونیکیت (پروب در سطح مخلوط قرار داده شد) شدند. برای این منظور، هر نمونه به مدت ۲۱ ثانیه (هر ۳ ثانیه سونیکاسیون، ۳ ثانیه استراحت) سونیکیت شدند.

تعیین اندازه ذرات (DLS)

به منظور اندازه گیری اندازه‌گیری حدودی طول و قطر نانوکریستال‌های سلولز و همچنین اندازه‌گیری قطر قطرات امولسیون در هر مرحله از دستگاه پراش نور دینامیک (DLS) استفاده شد (Malvern Instruments, U.K.). برای اندازه‌گیری نمونه‌های نانوکریستال سلولزی، تمام آزمون‌ها روی سوسپانسیون رقیق شدهی ۰/۱ g/L که در آن ذرات نانوسلولز به صورت اتفاقی قرار گرفته‌اند انجام پذیرفت. قبل از هر اندازه گیری نمونه‌ها به مدت ۳۰ ثانیه، برای ایجاد پراکندگی ذرات مناسب، تحت سونیکاسیون قرار گرفتند. این روش اندازه‌گیری غیرمستقیم پراکندگی اندازه ذرات را نشان می‌دهد. نتایج به صورت میانگین سه بار اندازه‌گیری گزارش شدند. برای اندازه‌گیری قطر ذرات امولسیون در هر مرحله نیز از این دستگاه استفاده گردید و نتایج توسط نرم افزار ImageJ آنالیز شد. برای این منظور نمونه‌ها تا ۲۰ برابر توسط آب دیونیزه رقیق شدند و سپس آزمون‌ها با ۳ بار تکرار انجام پذیرفتند و نتایج این بخش به صورت محاسبه میانگین قطر سطحی (۲ و ۳) D یا همان قطر میانگین ساتر^۷ گزارش شدند

تصویربرداری با میکروسکوپ نوری:

برای بررسی ساختار قطرات امولسیون‌ها در هر مرحله تصویربرداری با استفاده از میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین عکاسی انجام پذیرفت. (Carl Zeiss standard 20, Generic Digital 1" C-Mount) برای این منظور ۲۰ μL از امولسیون به یک میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر اضافه گردید و بوسیله ورتکس مخلوط شد سپس یک قطره از امولسیون روی یک اسلاید قرار گرفت و در بزرگنمایی ۴۰× تصویرها گرفته شدند.

پراش پرتو ایکس (XRD)^۱

درجه کریستالی الباف پنبه و نانوذرات سلولز و تاثیر فرایند بر روی این فاکتور توسط دستگاه پراش پرتو ایکس XRD D5000 (SIEMENS Ltd., Germany) مورد مطالعه قرار گرفت. برای تهیه رفراکتوگرام اشعه ایکس نمونه‌ها در جهت عمود بر تابش اشعه ایکس قرار گرفتند. دستگاه با توان ۳۵ کیلوولت و جریان ۳۰ میلی‌آمپر تنظیم شد. دمای آزمون همان دمای محیط بود. الگوی پراش پرتو ایکس عمود بر نمونه‌ها در زاویه پراش پرتو ایکس ۵ تا ۵۰ درجه با سرعت اسکن ۰/۰۲ درجه برثانیه به دست آمد. درجه نسبی کریستالی (CRI) سپس با استفاده از روش تجربی با اندیس کریستالی سگال^۲ طبق فرمول زیر محاسبه شد (Segal et al., 1959)

$$\text{CRI}\% = \frac{I_{002} - I_{am}}{I_{002}} \quad (\text{رابطه } ۲)$$

که در آن CrI: درصد کریستالیزاسیون و I_{am} و I_{002} شدت پیک‌ها در مواد کریستالی و آمورفی (به ترتیب) را نشان می‌دهند.

طیف سنجی فروسرخ فوریه مجهز به سیستم بازتاب کل دقیق (ATR)^۳

تغییرات ایجاد شده روی الیاف سلولز پس از تیمار اسیدی و تبدیل شدن آن به نانوکریستال سلولز توسط این دستگاه مورد مطالعه قرار گرفت (Specac Ltd., UK) به علت اینکه نمونه‌ی الیاف پنبه قابلیت پودر شدن (برای آزمون FTIR) کمی داشت از سیستم ATR که دستگاه جانبی FTIR می‌باشد استفاده شد. نمونه‌ها بدون آماده‌سازی بیشتر و مستقیم روی کریستال روی-سلنیوم (ZnSe) قرار گرفتند و طیف فروسرخ مربوط به آن نمونه‌ها تهیه و خوانده شد.

میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM)^۴

میکروسکوپ نیروی اتمی برای توپوگرافی^۵ نانوذرات سلولز مورد استفاده قرار گرفت. (Dual scope/Raster scope C26, Scanner) (DS95-50E, DME (Denmark)). عکس‌ها در حالت غیر تماسی^۶ گرفته شدند. برای این منظور نمونه سوسپانسیون نانوکریستال سلولز تا غلظت ۱۰۰ μg ml⁻¹ رقیق سازی شد و سپس یک دقیقه تحت سونیکاسیون قرار گرفت در مرحله بعدی یک قطره از نمونه روی سطح میکا ریخته شد و در مجاورت هوا

1. X-Ray Diffraction

2. Segal's crystallinity index

3. Attenuated Total Reflection- Fourier Transform Infra-Red

4. Atomic Force Microscopy

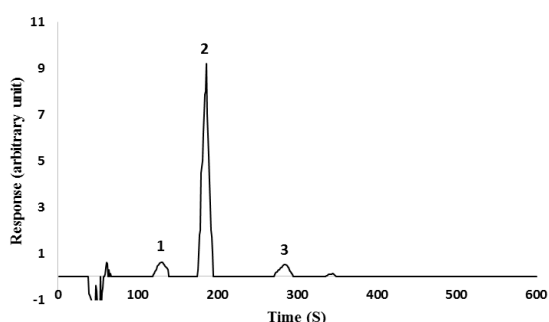
5. Topography

6. Non-contact

7. Sauter mean diameter

اندازه‌گیری پتانسیل زتا:

گلوکانی سلولز را پروتونه می‌کند. سپس با افزودن آب، پیوندهای گلیکوزیدی به آرامی از هم جدا می‌شوند (Lu & Hsieh, 2010). قسمت‌های آمورف سلولز نسبت به واکنش‌های هیدرولیتیک حساس‌تر بوده و سریع‌تر تخریب می‌شوند (Hon & Shiraiishi, 2000). با افزایش مدت زمان واکنش هیدرولیز، تخریب قسمت‌های آمورف شدیدتر خواهد بود. طی هیدرولیز اسیدی گروه‌های استر سولفات به واحدهای گلوکزی متصل می‌شوند و به سبب داشتن بار منفی، دافعه الکترواستاتیکی بین آنها ایجاد می‌شود و به این ترتیب سوسپانسیون نانوکریستال سلولزی پایدار خواهد بود.



شکل ۱. نمودار مربوط به آزمون HPLC نمونه استخراج شده

برای اندازه‌گیری پتانسیل زتا نمونه‌ها و همچنین میزان پایداری امولسیون‌ها و بار کلی سیستم در مراحل مختلف تحقیق از آزمون پتانسیل زتا استفاده شد (Zetasizer Nano ZS, Malvern instruments Ltd., Malvern, and Worcestershire, UK). پتانسیل زتا برای امولسیون در طیف‌های مختلف pH (۴/۵-۸) و غلظت‌های نمک (۰-۱۰۰ میلی‌مولار) در شرایط استاندارد محیطی مورد بررسی قرار گرفت. برای جلوگیری از اثر پراکندگی چندگانه^۱، نمونه‌های امولسیونی تا غلظت ۰/۰۵ (w/w)٪ توسط آب دیونیزه رقیق شدند تا از بروز خطا در آزمون‌ها جلوگیری شود. نتایج به صورت میانگین سه قرائت از هر نمونه بیان شدند.

اندازه‌گیری پایداری امولسیون اولیه نسبت به خامه‌ای شدن:

آزمون پایداری نسبت به خامه‌ای شدن امولسیون‌ها توسط سانتریفوژ کردن در ۴۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه انجام پذیرفت. عمل سانتریفوژ فرایند خامه‌ای^۲ شدن را سرعت می‌بخشد. ارتفاع لایه خامه‌ای شده و جدا شده توسط کولیس دیجیتال اندازه‌گیری شد و این اندازه به حجم تبدیل گردید.

نتایج و بحث

بررسی محتوای کانتازانتین

کانتازانتین به عنوان متابولیت باکتری *Dietzia natronolimnaea* HSI تهیه شد و رنگدانه‌های قرمز-نارنجی را تولید کرد. سپس رنگدانه‌ها توسط اتانول استخراج شدند. کارتنوئید کل توسط روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد. آنالیز HPLC استخراج‌ها نشان داد که بیش از ۹۰٪ مخلوط حاوی کانتازانتین می‌باشد و نتایج مربوط به آزمون HPLC در شکل (۱) نشان داده شده‌اند. نتایج حاصل از این بررسی با نتایج Hojjati & et al., 2014 و Gharibzahedi & et al., 2013 که برای استخراج از همین گونه باکتری و همچنین پروتکل مشابه استفاده کردند، تا ۹۵٪ همخوانی داشت.

تولید و آنالیز نانوکریستال سلولز:

مکانیسم هیدرولیز اسیدی

نانو کریستال‌های سلولزی توسط هیدرولیز اسیدی الیاف پنبه به‌دست آمد. طی هیدرولیز اسیدی، اکسیژن گلیکوزیدی و یا اکسیژن موجود در حلقه‌های واحدهای D-گلوکوپیرانوزی زنجیره

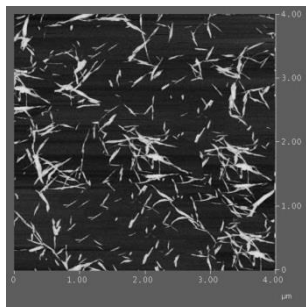
اندازه ذرات و مورفولوژی کریستال‌های سلولزی

پراکنش و اندازه‌ی تقریبی نانوکریستال‌های سلولزی با استفاده از دستگاه پراش نور دینامیک انجام پذیرفت. همان‌طور که در نمودار (۲) مشخص است ذرات داری یک پراکندگی بودند و اندازه متوسط ذرات ۱۱۲/۶ نانومتر بود. برای اندازه‌گیری قطر نانو ذرات و همچنین مشاهده مورفولوژی ذرات از عکس میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) استفاده شد. قطر ذرات کریستالی بین ۳-۷ نانومتر متغییر بود که این نتایج با نتایج تحقیقات پیشین که نشان دهنده‌ی میله‌ای بودن و قطر نانومتری ذرات نانوکریستال سلولزی هم‌خوانی داشت (Kvien et al., 2005). شکل (۳) عکس میکروسکوپ نیروی اتمی را نمایش می‌دهد. از تصاویر به‌دست آمده چنین برمی‌آید که ذرات میله‌ای شکل کریستال سلولزی طی روند خشک کردن و آماده‌سازی برای عکس‌برداری میکروسکوپی خمیده نشدند که به علت ساختار محکم و ماهیت الاستیکی قوی آن‌ها می‌باشد (Eichhorn et al., 2010).

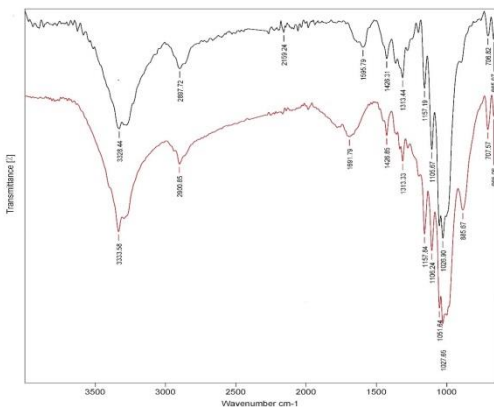
طیف سنجی فروسرخ تبدیل فوریه (ATR)

شکل (۴) مربوط به نمودارهای طیف سنجی فروسرخ تبدیل

1. Multiple scattering effect
2. creaming



شکل ۳. تصویر میکروسکوپ نیروی اتمی نانوکریستال سلولز.

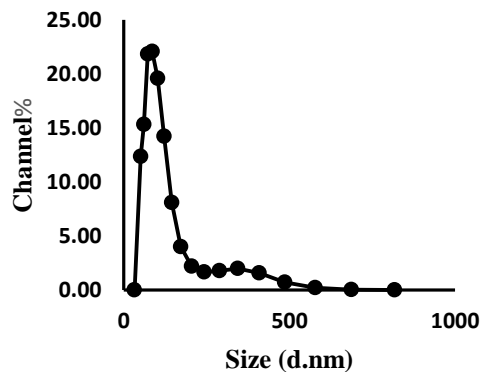


شکل ۴. مقایسه طیف سنجی فروسرخ تبدیل فوریه مجهز به ATR برای سلولز و نانوکریستال سلولز (به ترتیب طیف مشخص شده با رنگ مشکی مربوط به الیاف پنبه و طیف مشخص شده با رنگ قرمز مربوط به نانوکریستال سلولز می باشد).

پراش پرتو ایکس

شکل (۵) نمودار پراش پرتو ایکس مربوط به الیاف پنبه و نانوکریستال سلولز را نمایش می دهد. نتایج نشان دهنده حضور یک پیک قوی و تیز در $2\theta = 26/36^\circ$ و سه پیک ضعیف تر در $2\theta = 17/29^\circ$ ، $19/50^\circ$ ، $24/32^\circ$ ترتیب نماینده صفحات (۱۰۱) و (101) از سلولز نوع یک هستند که فراوان ترین نوع سلولز می باشند و شامل واحد های تکرار شونده β -(۱ به ۴) -D- گلوکوپیرانوزیدی در فرم زنجیره های موازی گلوکانی است. همچنین صفحه (۱۱۰) نمایشگر سلولز نوع ۲ می باشد. پیک قوی در $2\theta = 26/36^\circ$ نشان دهنده صفحه شبکه ای (۰۰۲) از سلولز نوع یک می باشد (Besbes et al., 2011; Park et al., 2010; Jiang et al., 2011; Li & Renneckar, 2011). با توجه به داده های مربوط به پراش پرتو ایکس و همچنین مطالعات انجام گرفته توسط Li و همکاران (۲۰۱۱)، مشخص شد که ساختار کریستالی سلولز پس از تیمار اسیدی تغییری نمی کند. نمایه بلورینگی برای سلولز و نانوسلولز به ترتیب برابر $75/4\%$ و $86/6\%$ به دست آمد. در دیگر

فوریه مجهز به ATR برای الیاف کتان و نانوکریستال سلولزی می باشد. در محدوده عدد موجی $3600-3328$ بر سانتی متر پیک نسبتاً گسترده ای مشاهده می شود که مربوط به لرزش کششی گروه OH آزاد مولکول سلولز می باشد. پیک مشاهده شده در 2900 بر سانتی متر مربوط به لرزش کششی گروه C-H سلولز می باشد. پیک مشاهده شده در عدد موجی در محدوده $1591-1661$ بر سانتی متر مربوط به آب جذب شده می باشد (Bajpai et al., 2013) که این پیک در نانوکریستال سلولز شدت بیشتری دارد. یک توضیح برای این اتفاق بیشتر بودن سطح منظر^۱ (نسبت طول به قطر) نانوکریستال ها نسبت به سلولز می باشد (Pakzad, 2011) که منجر به حضور بیشتر گروه های هیدروکسیل در نانوکریستال های سلولز و تشکیل پیوندهای هیدروژنی بیشتر با مولکول های آب می شوند. پیک موجود در عدد موجی 1426 بر سانتی متر نشان دهنده خمش در صفحه گروه های H-C-H و O-C-H می باشد. لرزش کششی گروه C-O پیکی را در عدد موجی 1051 نشان می دهد. همچنین کشش گروه C-O-C از پیوند اتری (β -D-۴-گلوکوزید) سلولز در عدد موجی 1159 بر سانتی متر نشان دهنده کریستال های سلولزی می باشد. جنبش کربن های ۵ و ۶ باعث تغییر حالت گروه های C-C-H و C-C-O و C-O-C و ایجاد عدد موجی در 885 بر سانتی متر می شوند. جذب در 665 بر سانتی متر نشان دهنده خمش در صفحه ی گروه C-O-H می باشد. همچنین نشان دهنده ساختار سلولزی ماده می باشد. سیگنال های 1421 ، 1157 ، 1106 و 885 بر سانتی متر نشان می دهند که نانوکریستال ها ابتدا در فرم سلولز نوع یک بوده اند.



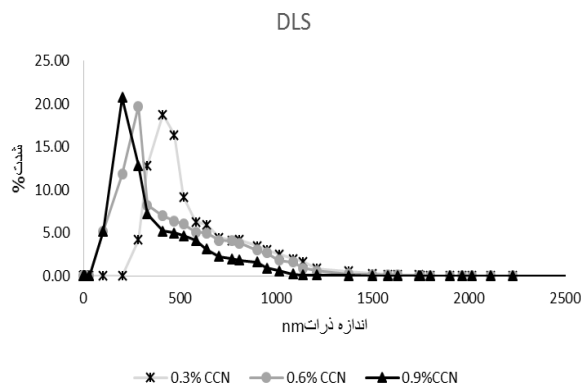
شکل ۲. پراکندگی و اندازه ذرات نانوکریستال سلولز با استفاده از دستگاه پراکنش نور دینامیک

Aspect ratio ۱.

جدول ۱- تغییرات اندازه قطر سطحی میانگین قطرات امولسیون پیکرینگ کانتازانتین

غلظت نانوکریستال سلولز (w/w%)	قطر سطحی میانگین قطرات امولسیون (nm)
۰/۳	۴۰۴±۵۱
۰/۶	۲۹۹±۳۸
۰/۹	۲۴۶±۱۷*

ستاره نشان دهنده اختلاف معنی دار ($p < 0/05$) در هر ستون می باشد.



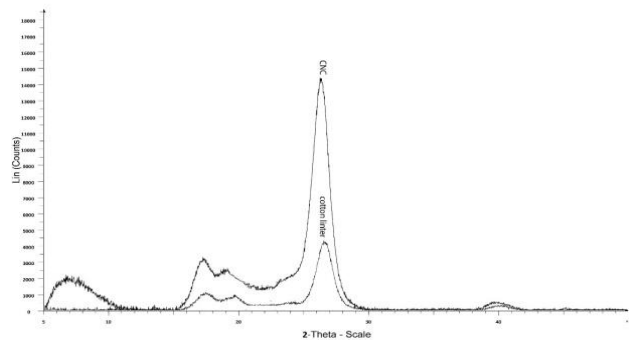
شکل ۶. نمودار تغییرات اندازه قطرات امولسیون با غلظت های مختلف نانوکریستال سلولز

همانطور که از نمودار و جدول مشخص می باشد، با افزایش غلظت نانوذرات اندازه قطرات کوچکتر می شود. اندازه قطرات نشان دهنده ی رابطه مستقیم غلظت کم و به هم پیوستگی قطرات می باشد. وقتی مقدار نانوذرات در نمونه کم باشد، همزنی با سرعت صوت منجر به تولید قطرات بزرگتر می شود. قطرات حاصل با مقدار کم ذرات به طور کامل پوشیده نمی شوند و در نتیجه وقتی سونیکاسیون متوقف می شود، قسمت هایی از قطرات که با نانوذرات پوشیده نشده اند شروع به بهم پیوستن می کنند و میانگین اندازه ذرات افزایش می یابد. وقتی پوشش دهی کامل صورت می گیرد که به اندازه ی کافی از ذرات در نمونه حضور داشته باشد، در نتیجه ذرات کوچکتر پایدارتر تشکیل می شود (kalashnikova et al., 2011). شکل (۷) نشان دهنده ی عکس میکروسکوپی از نمونه های امولسیونی با غلظت های مختلف نانوسلولز می باشد. شکل نشان دهنده افزایش اندازه ی قطرات با کاهش مقدار نانو کرسیتال ها می باشد.

پایداری امولسیون اولیه

امولسیون های پیکرینگ با نسبت های ۲۰ به ۸۰ روغن در آب فرموله شدند. مقدار ۰/۶٪ وزنی نانوکریستال سلولز در این بخش از تحقیق به عنوان نمونه اصلی در امولسیون ها استفاده شد.

تحقیقات نمایه کریستالینگی نانوسلولزها ۷۲/۵٪ و ۷۴٪ و ۷۵٪ به ترتیب برای نانوکریستال سلولزهای به دست آمده از تفاله سیب زمینی (Lu et. Al., 2013)، کرافت چوب نرم رنگبری شده (Li et. Al., 2011) و چوب هسته کناف^۱ (Chan et. al.,) (2011) گزارش شده است. در این پژوهش درصد کریستالینیتی به علت خلوص نسبتا بالای ماده اولیه به کار رفته برای هیدرولیز، بالا بود. سایر منابع سلولزی همچون چوب و تفاله های زیستی دارای همی سلولز و لیگنین و ناخالصی های دیگر می باشند که درصد کریستالینیتی را تحت شعاع قرار می دهند. علاوه بر منشاء سلولز، سایر پارامترها مانند دما و مدت زمان هیدرولیز روی خصوصیات کریستال های بدست آمده موثر خواهد بود. این خصوصیات شامل نمایه ی بلورینگی، مقدار رطوبت، مساحت سطحی، تخلخل و وزن مولکولی می باشد (El-Hassan & Sakhawy, 2007). برای مثال افزایش مدت زمان واکنش منجر به تولید نانوذرات کوتاه تر دارای بار سطحی بیشتر و یکنواختی از لحاظ اندازه ی بیشتر خواهد شد (Beck-Conanedo et al., 2005). دماهای واکنش بالاتر (Habibi et al., 2010) و اعمال فراصوت (Pakzad et al., 2011) باعث کاهش اندازه نانوذرات خواهد شد.



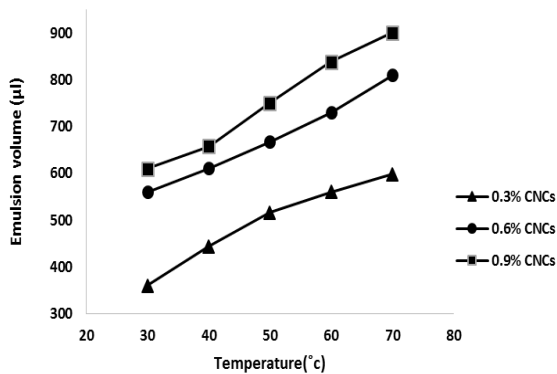
شکل ۵. نمودار پراش پرتو ایکس سلولز و نانو کریستال سلولز (طیف بالایی مربوط به نانوکریستال سلولز و طیف پایین مربوط به لیاف پنبه می باشد).

بررسی صفات قطرات امولسیون اولیه

اندازه قطرات و تغییرات آن همانطور که در بخش مواد و روش ها آورده شد انجام پذیرفت. جدول (۱) نشان دهنده ی تغییرات اندازه قطر سطحی با تغییر غلظت مقدار نانوذرات می باشد. همچنین نمودار (۶) اندازه ذرات را با توجه به نتایج آزمون پراکندگی نور دینامیک نشان می دهد.

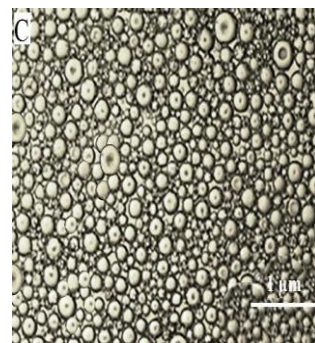
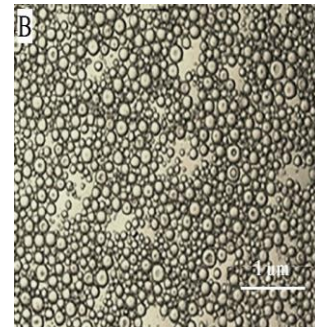
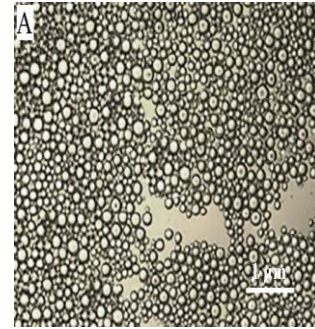
1. Kenaf core wood

تأثیر دما روی سیستم در گستره‌ی دمایی ۳۰ الی ۷۰ °C بررسی شد. نتایج نشان دادند که هرچه دما افزایش پیدا کرد، امولسیون‌ها پایداری بیشتری از خود نشان دادند. این پدیده را می‌توان با این تعریف که حرارت دهی باعث تغییرات غیرقابل برگشت ساختاری شد، توجیه کرد. انرژی جنبشی ذرات افزایش پیدا کرد و در نتیجه حرکت آن‌ها زیادتر شد و توانستند روی قطرات مجدداً نظم بگیرند. بعلاوه این انرژی بر انرژی بین ذرات و بین لایه‌های قرار گرفته غلبه می‌کند، در نتیجه فاصله بین ذرات کمتر می‌شود و پایداری بیشتر می‌شود (Wen *et al.*, 2014؛ Tzoumaki *et al.*, 2009). علاوه بر این، تأثیر غلظت نانوکریستال سلولز بر روی پایداری امولسیون مستقیم بود. یعنی با افزایش غلظت نانوکریستال‌ها و افزایش دما پایداری افزایش یافت. شکل (۸) روند تأثیر افزایش دما روی پایداری امولسیون‌ها با غلظت‌های مختلف نانوکریستال را نشان می‌دهد.



شکل ۸. نمودار تغییرات حجم امولسیون بعد از تیمار حرارتی و سانتریفیوژ، نمونه‌های امولسیون با غلظت‌های (A) ۰/۳ (B) ۰/۶ و (C) ۰/۹ درصد وزنی نانوسلولز بعد از تیمار حرارتی و سانتریفیوژ

پایداری امولسیون در pH و غلظت‌های یونی مختلف توسط اندازه‌گیری پتانسیل زتای نمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور پتانسیل زتای نانوکریستال سلولز و امولسیون‌ها در گستره‌ای از pH و غلظت یونی مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. نتایج نشان دادند که پتانسیل زتای امولسیون‌ها در غلظت ۰/۶٪ از نانوکریستال سلولز در گستره‌ی غلظت NaCl از رویه مشابه نانوکریستال سلولز در فاز آبی در همین شرایط پیروی می‌کند. نتایج در شکل (۹-۸) نشان داده شده‌اند. محلول آبی حاوی ۰ الی ۱۰۰ میلی‌مولار NaCl به فاز آبی نانوکریستال سلولز و امولسیون‌ها اضافه شد. هر چه مقدار غلظت نمک افزایش پیدا کرد، تمایل نانوکریستال‌ها به کلوخه‌ای شدن و تجمع افزایش یافت که این اتفاق در نتیجه‌ی کاهش نیروی دافعه‌ی بین ذرات در اثر افزایش غلظت الکترولیت



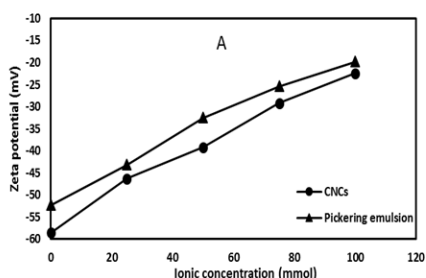
شکل ۷. تصویر میکروسکوپ نوری از امولسیون‌ها با (A) ۰/۹٪ (B) ۰/۶٪ - (C) ۰/۳٪ نانوکریستال سلولز

علیرغم تیمارهای مکانیکی مختلف (استفاده از ورتکس، استفاده از همزن با دور بالا)، پایداری بسیار خوبی در نمونه‌ها دیده شد. بعد از گذشتن یک ماه در دمای ۴ °C و ۴۰ °C و همچنین نگهداری در دمای ۸۰ °C بیش از دو ساعت تغییری در اندازه قطرات دیده نشد. برای بررسی بیشتر، نمونه‌ها رقیق سازی شدند و نتایج مشابهی مشاهده شد که بیانگر جذب برگشت‌ناپذیر ذرات روی سطح قطرات بودند. تست‌های بیشتری برای بررسی پایداری امولسیون‌ها صورت پذیرفت. برای اندازه‌گیری پایداری امولسیون‌ها روش‌های متفاوتی وجود دارد، یکی از روش‌های رایج استفاده از سانتریفیوژ می‌باشد (Kalashnikova *et al.*, 2013). این روش مخصوصاً برای امولسیون‌هایی با پایداری بالا مناسب می‌باشد زیرا در این روش نیروی سانتریفیوژ باعث سرعت بخشیدن به فرایند خامه‌ای شدن می‌شود. پایداری سیستم امولسیونی در برابر فاکتورهای مختلف محیطی بررسی شد. برای این منظور تأثیر فاکتورهایی مثل دما، pH غلظت یونی بر روی پایداری مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا

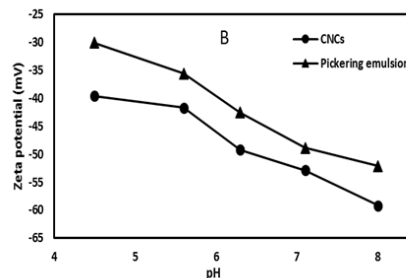
یونی مختلف صورت گرفت برای pH نیز تکرار شد. همانطور که در شکل‌های B-۹ مشاهده می‌شود، پتانسیل زتای نمونه‌های حاوی ۰/۶٪ سوسپانسیون نانوکریستال سلولز و امولسیون آن، با افزایش pH، افزایش یافت. پتانسیل زتا در تمام مراحل تغییر pH منفی باقی ماند که دلیل آن احتمالاً حضور گروه‌های C- $O-SO_3^-$ روی نانوذرات بود. بعلاوه نانوکریستال سلولز هیچ گروه کاتیونی نداشت، در نتیجه در هیچ مقدار از pH نتایج مثبت نبود. هرچه مقدار pH افزایش یافت، مقدار بار منفی روی قطرات از $pH=۴/۵$ در $pH=۸$ در $-۳۰/۱۱mV$ به $-۵۹/۲mV$ در $pH=۸$ افزایش یافت. این اتفاق ممکن است به دلیل پروتون زدایی از برخی گروه‌های پروتونه‌ی کربوکسیل ($COOH \rightarrow COO^- + H^+$) صورت گیرد (Suphantharika & Winuprasith, 2013). بدیهی است که افزایش بار سطحی باعث افزایش پایداری امولسیون به دلیل افزایش نیروهای دافعه‌ی بین قطرات می‌شود که ریسک کلوخه‌ای شدن و به هم پیوستگی^۲ را کم می‌کند.

بود (Tzoumaki et al., 2011). وقتی غلظت NaCl به ۱۰۰ میلی مولار رسید، مقدار کمی از نانوکریستال‌ها کلوخه‌ای شدند و پتانسیل زتای سوسپانسیون و امولسیون به محدوده‌ی با بار سطحی کم $-۲۰mV$ رسید. مشاهده شد که پتانسیل زتای مطلق امولسیون در تمام گستره‌ی غلظت یونی کمتری از پتانسیل زتای سوسپانسیون سلولز نانوکریستال بود. کم‌تر بودن این مقدار می‌تواند به علت بارگذاری کم ذرات روی قطرات یا حضور ناخالصی یونی در نمونه باشد (Surh et al., 2006). مقدار پتانسیل زتای قطرات امولسیون با افزایش غلظت یونی از مقدار $-۵۲/۳mV$ در غلظت صفر NaCl به $-۱۹/۸mV$ در ۱۰۰ میلی مولار NaCl کاهش یافت که به علت اثر پوششی الکترواستاتیک گروه‌های $C-O-SO_3^-$ توسط یون‌های با بار مخالف (Na^+) بود. به‌طور کلی هرچه مقدار پتانسیل زتای مطلق نمونه بیشتر باشد نشان‌دهنده‌ی دافعه الکترواستاتیک^۱ بیشتر و در نتیجه پایداری بیشتر در بار سطحی می‌باشد. نتایج مشابه آنچه برای غلظت‌های

2. coalescence



1. Electrostatic repulsion



شکل ۹. (A) تاثیر تغییر غلظت یونی بر پتانسیل زتا و پایداری امولسیون و سوسپانسیون نانوسلولز (B) تاثیر pH بر پتانسیل زتا و پایداری امولسیون و سوسپانسیون نانوسلولز

امولسیون‌هایی با پایداری بیشتر شد. هر چه pH به سمت قلیایی حرکت کرد پایداری امولسیون بیشتر شد و همچنین در غلظت‌های یونی کم پایداری بهتر بود.

سپاسگزاری

بر خود لازم می‌دانم از صندوق حمایت از پژوهشگران ریاست جمهوری و همچنین قطب علمی فناوری‌های نوین به منظور تولید غذاها و نوشیدنی‌های فراسودمند و همچنین از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تهران به جهت حمایت‌های مادی و معنوی تشکر و قدردانی نمایم.

REFERENCES

Chen, J., Vogel, R., Werner, S., Heinrich, G., Clause, D., & Dutschk, V. (2011). Influence of the particle type on the rheological behavior of

نتیجه گیری کلی

امولسیون‌های پیکرینگ، امولسیون‌هایی با پایداری فوق بالا می‌باشند و این خصیصه آن‌ها را به عنوان جایگزین‌های خوب برای امولسیفایرهای سنتزی کرده است. کانتازانتین رنگدانه‌ای با خاصیت آنتی اکسیدانی بالا، محلول در چربی و حساس به شرایط محیطی می‌باشد. برای افزایش کارایی این رنگدانه در صنایع آرایشی و غذایی استفاده از امولسیون‌های پیکرینگ که پایداری این رنگدانه را نسبت به شرایط محیطی بیشتر می‌کند و همچنین امکان استفاده از این رنگدانه در فاز آبی را ایجاد می‌کند، مفید واقع شد. امولسیون‌های حاصل شده دارای پراکندگی یکنواخت بودند. افزایش دما منجر به تشکیل

Pickering emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 382(1), 238-245.

- Tzoumaki, M. V., Moschakis, T., & Biliaderis, C. G. (2009). Metastability of nematic gels made of aqueous chitin nanocrystal dispersions. *Biomacromolecules*, 11(1), 175-181.
- Tzoumaki, M. V., Moschakis, T., Kiosseoglou, V., & Biliaderis, C. G. (2011). Oil-in-water emulsions stabilized by chitin nanocrystal particles. *Food hydrocolloids*, 25(6), 1521-1529.
- Wei, Z., Wang, C., Zou, S., Liu, H., & Tong, Z. (2012). Chitosan nanoparticles as particular emulsifier for preparation of novel pH-responsive Pickering emulsions and PLGA microcapsules. *Polymer*, 53(6), 1229-1235.
- Wen, C., Yuan, Q., Liang, H., & Vriesekoop, F. (2014). Preparation and stabilization of d - limonene Pickering emulsions by cellulose nanocrystals. *Carbohydrate Polymers*, 112, 695-700.
- Surh, J., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2006). Properties and stability of oil-in-water emulsions stabilized by fish gelatin, 20, 596-606.
- Tan, Y., Xu, K., Liu, C., Li, Y., Lu, C., & Wang, P. (2012). Fabrication of starch-based nanospheres to stabilize pickering emulsion. *Carbohydrate Polymers*, 88(4), 1358-1363.
- Eichhorn, S. J. et al. (2010) Review: Current international research into cellulose nanofibres and nanocomposites. *Journal of Materials Science*. 45: 1-33.
- El-Sakhawy, M., & Hassan, M. L. (2007). Physical and mechanical properties of microcrystalline cellulose prepared from agricultural residues. *Carbohydrate polymers*, 67(1), 1-10
- Dickinson, E. (2012). Use of nanoparticles and microparticles in the formation and stabilization of food emulsions. *Trends in Food Science & Technology*, 24(1), 4-12.
- Chan, H. C., Chia, C. H., Zakaria, S., Ahmad, I., & Dufresne, A. (2012). Production and characterisation of cellulose and nano-crystalline cellulose from kenaf core wood. *BioResources*, 8(1), 785-794.
- Beck-Candanedo, S., Roman, M., & Gray, D. G. (2005). Effect of reaction conditions on the properties and behavior of wood cellulose nanocrystal suspensions. *Biomacromolecules*, 6(2), 1048-1054.
- Besbes, I., Alila, S., & Boufi, S. (2011). Nanofibrillated cellulose from TEMPO-oxidized eucalyptus fibres: effect of the carboxyl content. *Carbohydrate Polymers*, 84(3), 975-983.
- Capron, I., & Cathala, B. (2013). Surfactant-free high internal phase emulsions stabilized by cellulose nanocrystals. *Biomacromolecules*, 14(2), 291-296.
- Bondeson, D., Kvien, I., & Oksman, K. (2006). Strategies for preparation of cellulose whiskers from microcrystalline cellulose as reinforcement in nanocomposites. *Oxford University Press*, 938, 10-25.
- Bajpai, S. K., Pathak, V., Chand, N., & Soni, B. (2013). Cellulose nano whiskers (CNWs) loaded-poly (sodium acrylate) hydrogels. Part-I. Effect of low concentration of CNWs on water uptake. *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 50(5), 466-477.
- Destribats, M., Rouvet, M., Gehin-Delval, C., Schmitt, C., & Binks, B. P. (2014). Emulsions stabilised by whey protein microgel particles: towards food-grade Pickering emulsions. *Soft matter*, 10(36), 6941-6954.
- Frelichowska, J., Bolzinger, M. A., & Chevalier, Y. (2010). Effects of solid particle content on properties of o/w Pickering emulsions. *Journal of colloid and interface science*, 351(2), 348-356.
- Habibi, Y., Lucia, L. A., & Rojas, O. J. (2010). Cellulose nanocrystals: chemistry, self-assembly, and applications. *Chemical reviews*, 110(6), 3479-3500.
- Hon, D. N. S., & Shiraiishi, N. (2000). Wood and cellulosic chemistry, revised, and expanded. CRC press.
- Jiang, F., Esker, A. R., & Roman, M. (2010). Acid-catalyzed and solvolytic desulfation of H2SO4-hydrolyzed cellulose nanocrystals. *Langmuir*, 26(23), 17919-17925.
- Kalashnikova, I., Bizot, H., Bertoncini, P., Cathala, B., & Capron, I. (2013). Cellulosic nanorods of various aspect ratios for oil in water Pickering emulsions. *Soft Matter*, 9(3), 952-959.
- Kalashnikova, I., Bizot, H., Cathala, B., & Capron, I. (2011). Modulation of cellulose nanocrystals amphiphilic properties to stabilize oil/water interface. *Biomacromolecules*, 13(1), 267-275.
- 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.
- Kvien, I., Tanem, B.S., Oksman, K., (2005). Characterization of cellulose whiskers and their nanocomposites by atomic force and electron microscopy. *Biomacromolecules*, 6, 3160-3165.
- Li, Q., & Renneckar, S. (2011). Supramolecular structure characterization of molecularly thin cellulose I nanoparticles. *Biomacromolecules*, 12(3), 650-659.
- Lu, H., Gui, Y., Zheng, L., & Liu, X. (2013). Morphological, crystalline, thermal and physicochemical properties of cellulose nanocrystals obtained from sweet potato residue. *Food Research International*, 50(1), 121-128.
- Lu, P., & Hsieh, Y. L. (2010). Preparation and properties of cellulose nanocrystals: rods, spheres, and network. *Carbohydrate Polymers*, 82(2), 329-336.
- Marku, D., Wahlgren, M., Rayner, M., Sjö, M., & Timgren, A. (2012). Characterization of starch Pickering emulsions for potential applications in topical formulations. *International journal of pharmaceuticals*, 428(1), 1-7.

- Pakzad, A. (2011). Nanomechanics of cellulose crystals and cellulose-based polymer composites. Dissertation, Michigan Technological University.
- Petersson, L., Kvien, I., & Oksman, K. (2007). Structure and thermal properties of poly (lactic acid)/cellulose whiskers nanocomposite materials. *Composites Science and Technology*, 67(11), 2535-2544.
- Rayner, M., Marku, D., Eriksson, M., Sjö, M., Dejme, P., & Wahlgren, M. (2014). Biomass-based particles for the formulation of Pickering type emulsions in food and topical applications. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 458, 48-62.
- Segal, L. G. J. M. A., Creely, J. J., Martin, A. E., & Conrad, C. M. (1959). An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. *Textile Research Journal*, 29(10), 786-794.
- Winuprasith, T., & Suphantharika, M. (2013). Microfibrillated cellulose from mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) rind: Preparation, characterization, and evaluation as an emulsion stabilizer. *Food Hydrocolloids*, 32(2), 383-394.
- Tasset, S., Cathala, B., & Capron, I. (2014). Versatile cellular foams derived from CNC-stabilized Pickering emulsions. *RSC Advances*, 893-898.
- Zoppe, J. O., Venditti, R. A., & Rojas, O. J. (2012). Pickering emulsions stabilized by cellulose nanocrystals grafted with thermo-responsive polymer brushes. *Journal of colloid and interface science*, 369(1), 202-209.
- Li, Q., & Rennecker, S. (2011). Supramolecular structure characterization of molecularly thin cellulose I nanoparticles. *Biomacromolecules*, 12(3), 650-659
- Chandi, G.K., Gill, B.S., (2011). production and characterization of microbial carotenoids as an alternative to synthetic colors: a review. *International journal of food properties*. 14, 503-513.
- Gharibzahedi, S. M. T., Razavi, S. H. & Mousavi, M. (2014) Characterizing the natural canthaxanthin/2-hydroxypropyl- β - cyclodextrin inclusion complex. *Carbohydrate Polymer*. 101, 1147-1153.
- Gharibzahedi, S. M. T., Razavi, S. H. & Mousavi, S. M. (2013a). Ultrasound-assisted formation of the canthaxanthin emulsions stabilized by arabic and xanthan gums. *Carbohydrate Polymer*. 96, 21-30
- Kalashnikova, I., Bizot, H., Bertoncini, P., Cathala, B., & Capron, I. (2013). Cellulosic nanorods of various aspect ratios for oil in water Pickering emulsions. *Soft Matter*, 9(3), 952-959.
- Razavi, S. H., Blanchard, F., & Marc, I. (2006). UV-HPLC/APCI MS method for separation and identification of the carotenoids produced by *Sporobolomyces ruberrimus* H110. *Iranian Journal of Chemistry & Chemical Engineering*, 25, 1-10.
- Schiedt, K., Liaaen-Jensen, S., (1995). Isolation and analysis. In: Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. (Eds.), *Carotenoids: Isolation and Analysis*. Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 81-108