

نانوریزپوشانی روغن پوست پرتقال در ساختار آمیلوز با استفاده از تنش مکانیکی (فراصوت) - حرارتی

محمد گنجه¹ - سید مهدی جعفری^{2*} - مهرداد نیاکوثری³ - علی محمد تمدن⁴ - یحیی مقصدلو⁵

تاریخ دریافت: 1396/03/12

تاریخ پذیرش: 1396/06/04

چکیده

با توجه به محدودیت‌های تکنولوژیکی استفاده از ترکیبات دارای ارزش تغذیه‌ای برای افزودن مستقیم به فرمولاسیون‌های مواد غذایی، تکنیک ریزپوشانی برای رفع این محدودیت‌ها و بهبود استفاده از این ترکیبات در سال‌های اخیر گسترش یافته است. در این پژوهش روغن پوست پرتقال حاوی 92 درصد لیمون با اعمال همزمان تنش مکانیکی (فراصوت) و حرارت در درون نانوذرات آمیلوز موجود در نشاسته ذرت حاوی آمیلوز بالا (70 درصد آمیلوز) نانوریزپوشانی گردید. با اعمال تیمار فراصوت نانوذرات با اندازه حدود 42-8 نانومتر و کارایی ریزپوشانی و کارایی بارگیری به ترتیب 82-28 و 0/38-1/41 درصد تهیه شد که نشان‌دهنده کارایی بالای این روش در تهیه نانوذرات آمیلوز بدون نیاز به مواد شیمیایی است. مقادیر پتانسیل زتای تیمارهای مختلف در محدوده 11/40- تا 40- قرار داشت که بیانگر تفاوت چشمگیر در میزان پایداری آنهاست. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روشی نیز توانایی انرژی کاپوتاسیونی فراصوت برای تبدیل گرانول‌های بزرگ نشاسته به ذرات کروی با ابعاد نانومتری را نشان می‌دهد. با توجه به مزایای متعدد تولید نانوذرات از نظر میزان زیست‌دسترسی، مزایای تکنولوژیکی و تغذیه‌ای و از طرفی حذف مواد شیمیایی در مرحله تولید این ذرات و همچنین سهولت و مزیت اقتصادی روش فراصوت، با در نظر گرفتن نتایج به دست آمده می‌توان این روش را راهکاری سودمند و قابل قبول برای نانوریزپوشانی ترکیبات تغذیه‌ای و زیست فعال توسط نانوذرات حاصل از گرانول‌های نشاسته ارزیابی نمود.

واژه‌های کلیدی: نانوریزپوشانی، لیمون، آمیلوز، فراصوت، نانوذرات

مقدمه

به دام‌اندازی ترکیبات زیست‌فعال و دارای ارزش تغذیه‌ای در ترکیبات حامل در مقیاس نانومتری، نانوریزپوشانی نامیده می‌شود. از مزایای کاهش اندازه کپسول در حد نانومتر می‌توان به افزایش حلالیت و کاهش سرعت ته‌نشینی ذرات (به‌خصوص در مورد ترکیبات کم محلول در آب)، شفافیت بیشتر سوسپانسیون حاصل (Jafari et al., 2006)، افزایش زیست‌دسترسی (Ye et al., 2006) و رهایش کنترل شده ترکیبات (Ezhilarasi et al., 2013) اشاره کرد. دی‌لیمون به‌عنوان مهم‌ترین ترکیب سازنده روغن پوست پرتقال، بسته به نوع میوه بین 80-95 درصد ترکیبات فرار موجود در روغن پوست پرتقال را تشکیل می‌دهد (Elegbede et al., 1986). این ماده به‌عنوان جزء اصلی ترکیبات معطر مرکبات، خصوصیات تکنولوژیکی (عطر و طعم)، ضدسرطانی (Rabi and Bishayee, 2003, Raphael and Kuttan, 2009) و ضد میکروبی دارد. با این وجود، محدودیت‌های تکنولوژیکی (ساختار آب‌گریز، واکنش‌پذیر بالا، حساسیت به اکسایش و فراریت) اغلب مانع استفاده مناسب از این ترکیب به‌عنوان یک مکمل تغذیه‌ای بوده است (Anandaraman and Reineccius, 1986).

در چند سال اخیر تولید محصولات فراسودمند با افزودن ترکیبات زیست‌فعال و دارای خواص تغذیه‌ای رشد چشمگیری داشته است. این ترکیبات معمولاً نسبت به شرایط محیطی و یا دستگاه گوارش حساس بوده و به علت واکنش‌های مخرب، میزان زیست‌دسترسی آنها محدود می‌گردد (Barrow et al., 2009). ریزپوشانی فرایندی متداول است که در صنایع غذایی با هدف کاهش این واکنش‌های مخرب و همچنین رساندن هدفمند و موثر ترکیبات زیست فعال به کار گرفته می‌شود (Madene et al., 2006).

- 1 و 2 - دانشجوی دکتری، دانشیار و استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.
- 3 - استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز.
- 4 - دانشیار، گروه نانوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز.

*مسئول مکاتبات: (Email: Jafarism@hotmail.com)
DOI: 10.22067/iftstr.v1396i0.64845

دلیل صرفه‌جویی در مصرف انرژی، کاهش زمان فرایند و افزایش بهره‌وری ریزپوشانی مورد استفاده قرار گرفته است (Mason *et al.*, 1996). پدیده کاویتاسیون در فراصوت شامل تشکیل، توسعه و متلاشی شدن میکروحباب‌های موجود در محلول است که باعث تولید مقادیر بالای انرژی، دما و فشار بالا در محلول و نابودی باندهای بین‌مولکولی در پلیمرها می‌شود (Kawasaki *et al.*, 2007). نتایج مطالعات تأثیر تیمار فراصوت بر روی ویژگی‌های مختلف نشاسته، حاکی از بهبود حلالیت، قدرت جذب آب و میزان تورم (Hasanvand *et al.*, 2015)، کاهش شاخص قوام و آنتالپی ژلاتیناسیون (Liu *et al.*, 2009) و کاهش وزن مولکولی ناشی از شکستگی ساختار ماکرومولکولی نشاسته (Jambrak *et al.*, 2010) بوده است. تخریب فیزیکی گرانول‌های نشاسته با اعمال تیمار فراصوت نیز در مطالعات مختلفی تأیید شده است (Degrois *et al.*, Zhu *et al.*, 2012, 1974).

Gökmen و همکاران (2011) از نشاسته ذرت با آمیلوز بالا² (HACS) برای ایجاد نانوذرات حاوی اسیدهای چرب امگا3 استفاده کردند. این امولسیون حاوی نانوذرات در فرمولاسیون نان برای بررسی ویژگی‌های کیفی به کار رفت. نتایج این مطالعه حاکی از امکان افزودن مقدار قابل توجهی از امگا3 نانوریزپوشانی شده در ساختار آمیلوز، به نان بدون تأثیر بر ویژگی‌های حسی آن بود. Lesmes و همکاران (2009) به منظور استفاده از بیوپلیمر نشاسته برای رسانش کنترل شده، از نشاسته‌های حاوی نسبت‌های متفاوت آمیلوز - آمیلوپکتین برای ریزپوشانی استریک اسید استفاده کردند. با استفاده از روش همونیزاسیون ذرات وی‌آمیلوز با ابعاد 0/04 تا 3 میکرومتر تشکیل گردید که رهایش استریک اسید درون آنها فقط تحت تأثیر آنزیم آمیلاز امکانپذیر بود. Hasanvand و همکاران (2015) ویتامین D₃ را در نشاسته ذرت آمیلوز بالا با استفاده از روش فراصوت و با کارایی بالا ریزپوشانی کردند. این محققین بیشترین میزان رهایش ویتامین D₃ کپسوله شده را در روده کوچک عنوان کردند و استفاده از این نانوذرات برای غنی‌سازی شیر بدون تأثیر منفی بر ویژگی‌های حسی آن را نیز اثبات نمودند. از جمله دیگر مطالعاتی که از گرانول‌های نشاسته برای ریزپوشانی ترکیبات زیست‌فعال و معطره مختلف استفاده کرده‌اند می‌توان به Le Bail و همکاران (2005) و Jouquand و همکاران (2006) و Heinemann و همکاران (2003) اشاره کرد.

با توجه به نقش ارزشمند رساندن هدفمند و کنترل شده ترکیبات زیست‌فعال از نظر تغذیه‌ای و سلامتی و از طرفی اهمیت استفاده از مواد حامل سازگار با مواد غذایی مانند نشاسته و با در نظر گرفتن نقش مکمل اثبات شده‌ای که بین آنزیم آمیلاز و آمیلوز جهت رهایش

معمولاً در صنعت غذا از ترکیباتی که منشأ کربوهیدراتی، لیپیدی و یا پروتئینی دارند به‌عنوان پوشش یا حامل در ریزپوشانی استفاده می‌شود (Chen *et al.*, 2006, Mozafari *et al.*, 2008). عوامل متعددی از جمله دسترسی آسان و ارزان، داشتن گروه‌های فعال در تعامل با ترکیبات آب‌گریز و آب‌دوست، تجزیه بیولوژیکی، سازگاری زیستی و مقاومت حرارتی نسبتاً بالا، کربوهیدرات‌ها را نسبت به حامل‌های لیپیدی و پروتئینی برتری داده است (Fathi *et al.*, 2014). یکی از مهم‌ترین ترکیبات پلی‌ساکاریدی موجود در طبیعت که مزایای متعددی جهت استفاده به‌عنوان حامل را دارا می‌باشد، نشاسته است (Marques *et al.*, 2002, Araújo *et al.*, 2004). مطالعات نشان داده‌اند که گرانول‌های نشاسته از تعداد بسیار زیادی ذرات نیمه‌متبلور در مقیاس نانو تشکیل شده‌اند (Gallant *et al.*, 1997) که با فرایندهای فیزیکی و هیدرولیز ملایم اسیدی یا آنزیمی این نانوذرات قابل استخراج و تهیه از نشاسته هستند (Kim *et al.*, 2009, Liu *et al.*, 2008). از سوی دیگر توانایی نشاسته در ریزپوشانی ترکیبات غذا- دارو و به‌خصوص مولکول‌های غیرقطبی به‌خوبی شناخته شده است (Kreuter, 2007, Simi and Abraham, 2007). بر همین اساس در مطالعات زیادی از نشاسته و مشتقات آن به‌عنوان نانوحامل استفاده شده است (Santander-Ortega *et al.*, 2010, Jain *et al.*, 2008, Yu *et al.*, 2007, Xiao *et al.*, 2015, Hasanvand *et al.*, 2006). نشاسته ترکیبی از دو پلیمر آمیلوز و آمیلوپکتین می‌باشد (Blanshard and Galliard, 1987). در حضور لیگاندهایی مانند ید و الکل‌های خطی، آرایش فضایی آمیلوز دچار تغییراتی می‌شود که حاصل آن یک مارپیچ چپ‌گرد موسوم به وی‌آمیلوز¹ است (Cohen *et al.*, 2008) که می‌تواند لیگاندها را در درون یا بین خمیدگی‌های حاصل از اتصالات گلوکز به دام اندازد (Helbert, Lalush *et al.*, 2005, Conde-Petit *et al.*, 2006). Chanzly (1994) دلیل تشکیل این ترکیبات را انرژی پایین لیگاندها در حفره آمیلوز ذکر کردند و همکاران (2001) نیروی محرکه تشکیل این ساختار را تمایل آمیلوز برای به حداقل رساندن واکنش‌های آن با آب دانسته‌اند.

عمده‌ترین روش‌های تولید این ساختار آمیلوز با ترکیبات زیست‌فعال را می‌توان به سه روش آنزیمی، کلاسیک و حرارتی - مکانیکی تقسیم کرد (Obiro *et al.*, 2012, Bhosale and Ziegler, 2010). روش‌های مکانیکی - حرارتی شامل استفاده هم‌زمان از حرارت و تنش مکانیکی برای تولید ساختارهای وی‌آمیلوز می‌باشد. این روش‌ها ژلاتینه‌شدن/خمیری شدن و تخریب گرانول‌های نشاسته را تشدید می‌کنند که این امر باعث تسهیل شکل‌گیری وی‌آمیلوز می‌شود (Sinha Ray *et al.*, 2012). روش فراصوت به‌طور گسترده‌ای به

(Lesmes *et al*, 2009). نسبت‌های مربوط به درصد آمیلوز و لیمون و همچنین زمان اعمال تنش فراصوت پس از مراحل متعدد آزمون و خطا برای دستیابی به ذراتی در سایز نانو و حداکثر راندمان انتخاب گردیدند. بر این اساس، فرمولاسیون‌های تعریف شده شامل 8 تیمار مختلف بود که به شرح جدول 1 می‌باشد. سوسپانسیون‌های به‌دست‌آمده در این مرحله با استفاده از خشک‌کن انجمادی (دنا و کیوم، ایران) به نمونه‌های پودری جهت آنالیزهای بعدی تبدیل شده و در ظروف غیرقابل نفوذ در یخچال نگهداری شدند

گرانروی سوسپانسیون‌های حاوی نانوذرات آمیلوز

گرانروی فرمولاسیون‌های مختلف از نانوذرات حاوی لیمون نانوریزپوشانی شده نیز با استفاده از ویسکومتر لوله موین (Schott-Gerate-Capillary-Viscometer-525-00، آلمان) تعیین شد. در ویسکومترهای لوله موین، مقدار گرانروی بر مبنای معادله هاگن-پویزلی⁴ (معادله 1) به‌دست می‌آید (Telis-Romero, 2001).

$$\eta = \frac{\pi r^4 t}{8VL} \quad (1)$$

در این معادله P: فشار، r: شعاع لوله موین، t: زمان جریان حجم مشخصی از سیال از لوله موین، V: حجم جریان و L: طول لوله موین می‌باشد. با جایگزینی ثابت ویسکومتر (K) به‌جای ثابت‌های معادله 1، می‌توان آن را به شکل معادله 2 خلاصه نمود.

$$\eta = kt \quad (2)$$

با تقسیم گرانروی آب در دمای 25 درجه سانتی‌گراد (0/89 سانتی‌پواز (cp)) بر مدت زمان لازم برای عبور 2 میلی‌لیتر آب مقطر بین دو خط نشانه، میزان ثابت ویسکومتر تعیین گردید. سپس مقادیر زمان به‌دست آمده برای عبور سوسپانسیون‌های حاصل از تیمارهای مختلف بین دو خط نشانه ویسکومتر در مقدار ثابت k ضرب شده و گرانروی نمونه‌ها بدست آمد.

تعیین اندازه نانوذرات آمیلوز و پتانسیل زتای مربوطه

اندازه ذرات و پتانسیل زتا با استفاده از روش پراکندگی نور دینامیکی⁵ (DLS) با استفاده از دستگاه‌های Nanotracc Flex In- situ Particle Size Analyzer و Microtracc ZETA-check تعیین گردید. اندازه‌گیری این شاخص‌ها پس از 24 ساعت و بدون رقیق‌سازی صورت گرفت.

آنالیز مورفولوژی و ریزساختار نانوذرات

مورفولوژی نانوذرات به‌دست‌آمده از آمیلوز با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (TESCAN-Vega3، جمهوری چک)

4 Hagen-Poiseuille Equation

5 Dynamic Light Scattering

دهانی و روده‌ای وجود دارد (Marcuse, 1984)، مطالعه امکان استفاده از این پتانسیل ضروری به‌نظر می‌رسد. بدین منظور هدف از این پژوهش بررسی میزان کارایی آمیلوز در نانوریزپوشانی لیمون به‌عنوان یک ترکیب زیست‌فعال تعیین گردید. همچنین توانایی سامانه فراصوت به‌عنوان روشی کم‌هزینه و بدون نیاز به مواد شیمیایی که قادر به تولید نانوذرات آمیلوز است، مورد ارزیابی قرار گرفته و کیفیت نانوذرات تولیدی بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

تعیین درصد لیمون در روغن پوست پرتقال استفاده شده

با توجه به این که در این پژوهش از روغن پوست پرتقال (کنسانتره مرکبات رامسر - ایران) استفاده شد، ابتدا باید میزان ماده موثره آن (لیمون) تعیین می‌شد که بدین منظور از دستگاه کروماتوگرافی گازی با آشکارساز یونیزاسیون شعله‌ای¹ (GC-FID) (مدل 3420A شرکت BIEFEN، آلمان) استفاده شد و بر اساس نتایج آنالیز نمونه لیمون خالص (سیگما آلدریج) و همچنین، نمونه به‌کاررفته در این پژوهش، مطابق شکل 1 بیش از 92 درصد نمونه استفاده شده از دی‌لیمون تشکیل شده است². با توجه به حساسیت لیمون به اکسیداسیون و همچنین نور، روغن پوست پرتقال در درون ظرف تیره و دربسته و در جای تاریک نگهداری گردید.

تهیه نانوذرات آمیلوز حاوی لیمون

جهت تهیه نانوذرات آمیلوز حاوی لیمون، محلول 0/1 مولار هیدروکسید پتاسیم (مرک، آلمان) در آب دیونیزه تهیه شده و سپس نشاسته ذرت آمیلوز بالا (HACS) (سیگما آلدریج، St. Louis, MO, USA) با 70 درصد آمیلوز³ در نسبت‌های 2 و 4 درصد به آن اضافه گردید و ضمن هم‌زدن مداوم به مدت 30 دقیقه در دمای 80 درجه سلسیوس قرار گرفت. سپس لیمون به میزان 5 و 10 درصد نسبت به میزان HACS استفاده شده به سوسپانسیون حاصل افزوده گردید و به مدت 1 دقیقه هم‌زدن ادامه یافت. سوسپانسیون اولیه حاصل با استفاده از سامانه فراصوت (مدل UP100 - هشلر، آلمان) با توان 100 وات و فرکانس 30 کیلوهرتز در مدت‌زمان‌های 9 یا 18 دقیقه مورد فرایند قرار گرفته و نانوذرات آمیلوز حاوی لیمون تهیه گردید

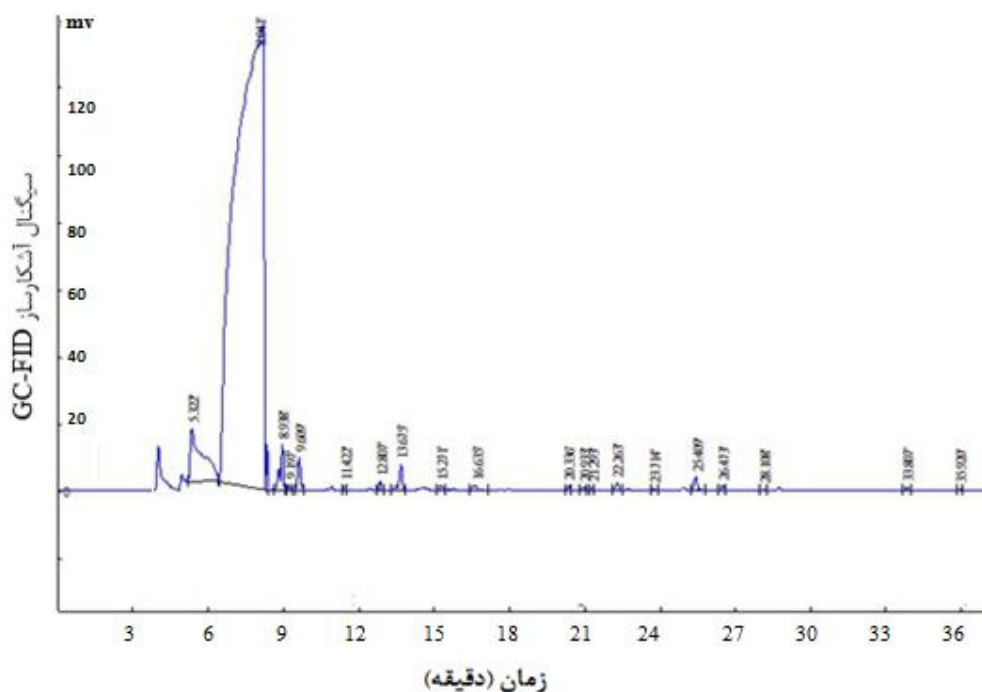
1 Gas Chromatography-Flame Ionization Detector

2 به دلیل درصد غالب لیمون در ترکیب استفاده شده به‌عنوان ماده هسته برای نانوریزپوشانی در این پژوهش، در ادامه به اختصار از لیمون به‌عنوان ماده هسته استفاده می‌شود.

3 به دلیل درصد بالای آمیلوز در ترکیب مورد استفاده و اهمیت این ترکیب در فرایند نانوریزپوشانی، در ادامه به اختصار از عبارت آمیلوز به‌عنوان ماده دیواره استفاده می‌شود.

طلا (Quorum Technologies- Q150R- ES، انگلستان) بر روی آن قرار گرفته و سپس عکس‌های موردنظر توسط میکروسکوپ الکترونی تهیه شد.

مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور یک قطره از محلول نانوذرات بر روی فویل آلومینیومی ریخته شده و پس از خشک شدن در دمای محیط، یک لایه بسیار نازک طلا از طریق دستگاه پوشش‌دهنده‌ی



شکل 1- آنالیز کروماتوگرافی گازی تعیین درصد لیمونن موجود در روغن پوست پرتقال استفاده شده

جدول 1- تیمارهای نانوذرات تهیه شده با استفاده از فراصوت با توان 100 وات

کد فرمولاسیون	زمان فراصوت (دقیقه)	غلظت آمیلوز (%)	نسبت لیمونن به آمیلوز (%)
4S10L18min	18	4	10
4S10L9min	9	4	10
4S5L18min	18	4	5
4S5L9min	9	4	5
2S10L18min	18	2	10
2S10L9min	9	2	10
2S5L18min	18	2	5
2S5L9min	9	2	5

نشده) گزارش گردید. پودر باقی‌مانده بر روی کاغذ فیلتر نیز در دمای محیط خشک شده و با ترازوی با دقت 0/001 گرم (DJ-V 320A، چین) وزن شد و سپس با استفاده از معادلات 3 و 4 به ترتیب کارایی ریزپوشانی¹ و کارایی بارگیری² تعیین گردید (Hasanvand *et al.*, 2015, Lesmes *et al.*, 2009).

1 Encapsulation efficiency
2 Loading efficiency

کارایی ریزپوشانی و کارایی بارگیری

مقدار 5 میلی‌گرم از پودر نانوذرات آمیلوز حاوی لیمونن حاصل از خشک‌کن انجمادی با 5 میلی‌لیتر حلال هگزان (مرک، آلمان) شستشو داده شده و پس از عبور دادن آن از کاغذ فیلتر واتمن شماره 1، میزان جذب هگزان فیلتر شده در طول موج 252 نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Model VIS-7220G/UV-Rayleigh - 9200، چین) اندازه‌گیری شده و به‌عنوان لیمونن آزاد (ریزپوشانی

مدت زمان طولانی‌تری قادر به معلق ماندن در محلول می‌باشند (Gary and Jarnagin, 1967). به همین دلیل، اعمال تیمار فراصوت باعث افزایش پایداری و یا به عبارت دیگر کاهش میزان رسوب و دو فاز شدن در سوسپانسیون نشاسته می‌شود (Jambrak *et al.*, 2010). با توجه به نتایج ارائه شده در جدول 2 غلظت آمیلوز بیشترین تأثیر را بر اندازه ذرات داشته است (مقدار F برابر با 46/35) و پس از آن مدت زمان اعمال تیمار فراصوت ($F=31/70$) مؤثرترین فاکتور است. تأثیر غلظت لیمون در سطح 95 درصد و همچنین مقادیر متقابل متغیرهای مستقل بر میزان تغییرات اندازه ذرات معنادار نبوده است. مطالعات متعدد دیگری نیز از تنش فراصوت برای تولید نانوذرات استفاده کرده‌اند که از آن جمله می‌توان به مطالعه Chang و همکاران (2017) در اعمال فرایند فراصوت بر روی محلول 5 درصد نشاسته اشاره کرد که این محققین فراصوت را روشی با کارایی بالا و کم هزینه برای دستیابی به نانوذرات نشاسته عنوان کرده‌اند و این فرایند را باعث همگنی در اندازه ذرات و کاهش اندازه آنها به کمتر از 75 نانومتر ارزیابی کرده‌اند. Hasanvand و همکاران (2015) نیز از نشاسته حاوی آمیلوز بالا برای نانوریزپوشانی ویتامین D3 استفاده کردند. اعمال تنش فراصوت با توان‌های 300 و 450 وات به مدت 10 دقیقه در غلظت‌های نشاسته 2 و 4 درصد باعث به دست آمدن ذراتی در ابعاد کمتر از 40 نانومتر در تیمارهای مختلف گردید که پایداری و کارایی ریزپوشانی مناسبی را نیز نشان دادند. در پژوهشی دیگر Haaj و همکاران (2013) از تنش فراصوت برای دستیابی به نانوذرات نشاسته در محلول آبی استفاده کردند. با اعمال 75 دقیقه تنش فراصوت با توان 100 وات توزیع اندازه ذرات یکنواختی با اندازه‌های بین 30 تا 100 نانومتر به دست آمد.

تأثیر تنش فراصوت و شرایط فرمولاسیون بر پتانسیل زتا
پتانسیل زتا یک عبارت علمی برای بیان پتانسیل الکتریکی در محلول‌های کلوئیدی است. در واقع پتانسیل زتا بیانگر اختلاف پتانسیل بین فاز پیوسته و فاز پراکنده می‌باشد. مقادیر بالای پتانسیل می‌تواند به عنوان شاخصی برای بیان میزان پایداری این سیستم‌ها باشد و از همگرایی و ته نشینی ذرات ممانعت کند. از جمله محققینی که به ارزیابی مقادیر پتانسیل زتای نانوامولسیون‌ها پرداخته‌اند و مقادیر بالای 30 (مثبت یا منفی) را باعث پایداری سیستم ذکر کرده‌اند می‌توان به Araújo و همکاران (2011)، Preetz و همکاران (2010) و Gao و همکاران (2011) اشاره کرد. پتانسیل زتای ذرات در ابعاد نانومتری، تحت تأثیر فاکتورهای متعددی شامل، منبع نانوذرت، مورفولوژی آنها، اندازه ذرات، pH محیط و میزان سورفاکتانت در سیستم می‌باشد (Simunkova *et al.*, 2009). بالاترین میزان پتانسیل زتا مربوط به نمونه با بیشترین غلظت آمیلوز

(1) $100 \times$ وزن لیمون اولیه استفاده شده / (وزن لیمون آزاد - لیمون کل) = کارایی ریزپوشانی

(2) $100 \times$ وزن نانوذرات / (وزن لیمون آزاد - لیمون کل) = کارایی ریزپوشانی

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

آزمایش‌ها در قالب آزمون فاکتوریل و به صورت کاملاً تصادفی با سه متغیر مستقل غلظت آمیلوز، غلظت لیمون و زمان فراصوت و در 3 تکرار انجام شد. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح 95 درصد و با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.0 و رسم نمودارها با نرم‌افزار اکسل (Excel 2010) انجام شد.

نتایج و بحث

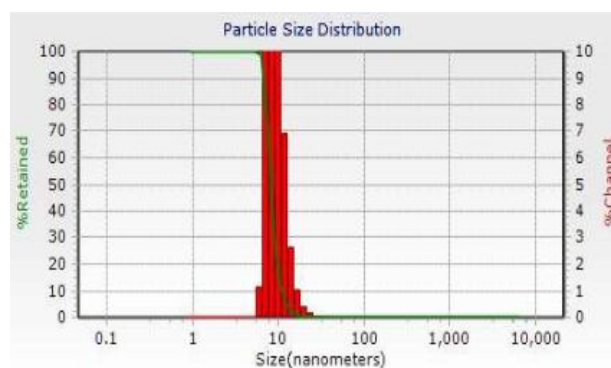
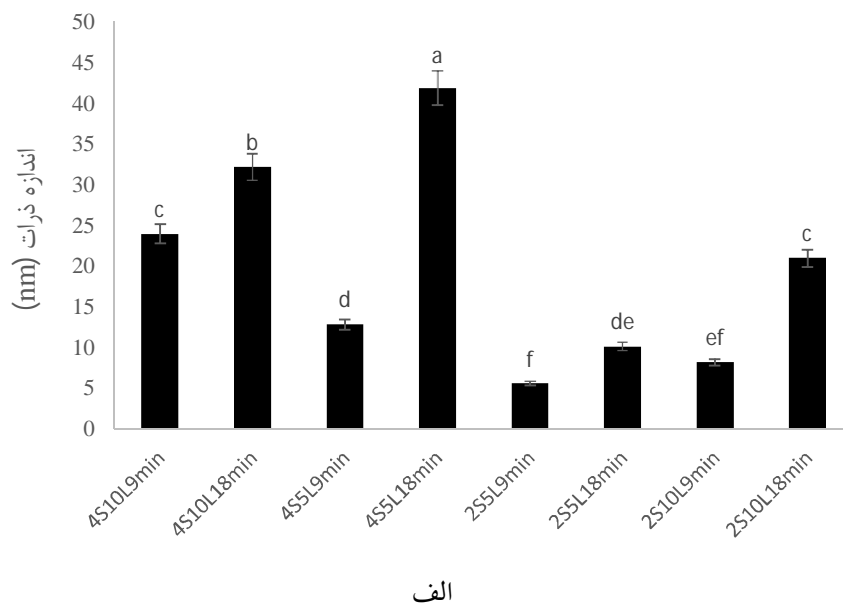
تأثیر تنش فراصوت و شرایط فرمولاسیون بر اندازه نانوذرات آمیلوز

در شکل 2 (الف) اندازه نانوذرات آمیلوز حاصل از اعمال تیمار فراصوت با توان 100 وات در زمان‌های 9 و 18 دقیقه و محلول‌های حاوی درصد‌های متفاوت آمیلوز و لیمون نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌گردد، در تمام فرمولاسیون‌ها اندازه ذرات کمتر از 50 نانومتر می‌باشد و در اکثر تیمارها، اختلاف معناداری در سطح 95 درصد وجود داشته است. شکل 3 یک نمونه از نتایج آنالیز اندازه ذرات را نشان می‌دهد (تیمار 2S10L9min). با اعمال فرایند فراصوت، گرانول‌های نشاسته در معرض تنش کاویتاسیون قرار می‌گیرند. با تشکیل مداوم حباب و سپس متلاشی شدن آنها، ضربات مکانیکی با انرژی فراوان به گرانول‌های نشاسته وارد می‌گردد. برخورد سریع مایع به این گرانول‌ها، اصابت خود ذرات با یکدیگر و از طرفی مقاومت این گرانول‌ها در برابر جریان مایع موجب شکستن ذرات نشاسته به ابعاد نانومتری می‌شود (Prozorov *et al.*, 2004, Patist and Bates, 2008).

با افزایش غلظت نشاسته از 2 به 4 درصد تأثیر نیروهای تخریبی فراصوت کاهش یافته و نسبت به غلظت کمتر، اندازه‌های بزرگ‌تری را در نانوذرات تولیدی آمیلوز موجب شده است. همچنین افزایش زمان فراصوت در محلول‌های با غلظت مشابه باعث افزایش نسبی اندازه نانوذرات تولیدی شده است. زمانی که موج‌دهی فراصوت بر نانوذرات طولانی می‌شود، ذرات کوچک‌تر به واسطه ارتعاشات ناشی از امواج فراصوت، شتاب گرفته و با هم برخورد می‌کنند. به این ترتیب توده‌ای از ذرات شکل گرفته و موجب افزایش نسبی اندازه نانوذرات می‌گردد. به طور کلی، با ابعاد نانومتری، پایداری بیشتری را برای سوسپانسیون نشاسته می‌توان متصور بود. طبق قانون استوک، ذرات کوچک‌تر

40 درصد بوده است. هرچه میزان عوامل فعال سطحی آمیلوز یعنی گروه‌های هیدروکسیل یونیزه شده مولکول‌های گلوکز افزایش یابد، بار سطحی و در نتیجه مقدار پتانسیل زتا افزایش می‌یابد (Khalloufi *et al.*, 2009). تأثیر غلظت لیمون در مقایسه با آمیلوز چندان چشمگیر نبوده و به میزان اندکی منجر به کاهش این شاخص شده است. با افزایش میزان لیمون از 5 به 10 درصد در تیمارهای حاوی 4 درصد آمیلوز و 18 دقیقه تیمار فراصوت، میزان پتانسیل زتا از -34 به -33- تغییر یافته است و تغییرات در سطح 95 درصد معنادار نبوده است (شکل 3).

بالاترین مقدار لیمون بود. با توجه به شاخص‌های گزارش شده در جدول 2، غلظت آمیلوز تأثیر عمده‌ای در تغییرات پتانسیل زتا داشته است ($F=161/33$). بارهای الکترواستاتیک سطحی آمیلوز را می‌توان از دلایل عمده بالاتر بودن پتانسیل زتا در نمونه‌های با غلظت 4 درصد آمیلوز ذکر کرد. به عنوان مثال، افزایش غلظت آمیلوز از 2 به 4 درصد در تیمارهای با 18 دقیقه تنش فراصوت و 5 درصد لیمون باعث افزایش 64 درصدی این شاخص از $-11/4$ به -34 شده است و اختلاف آن‌ها در سطح 95 درصد معنادار بوده است (شکل 3) و یا در تیمارهای مشابه و 9 دقیقه اعمال تنش فراصوت، این افزایش حدود



ب

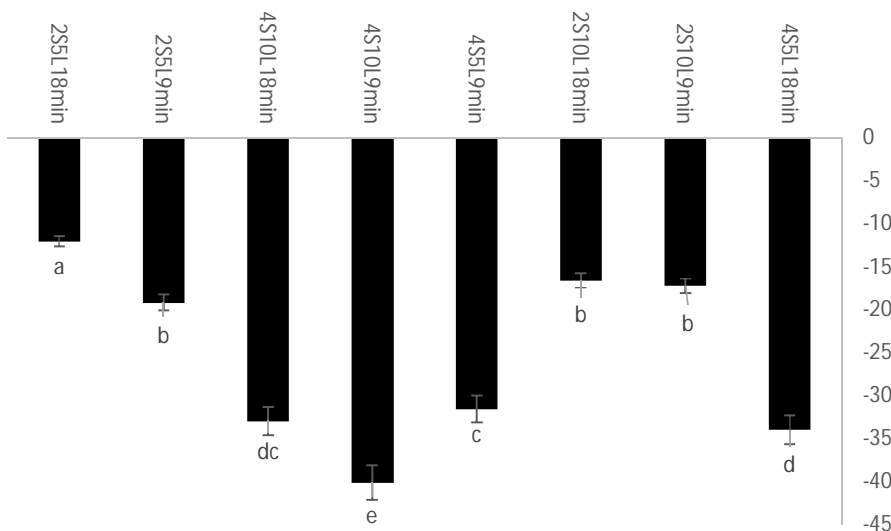
شکل 2- اندازه نانو ذرات حاصل از سوسپانسیون‌های حاصل از فرمولاسیون‌های مختلف آمیلوز حاوی لیمون (الف) و نمونه‌ای از آنالیز اندازه ذرات (2S10L9min) به روش پراکنندگی نور دینامیکی (ب)
*حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنادار در سطح 5 درصد می‌باشد (شکل 2 الف).

جدول 2- آنالیز واریانس جهت بررسی تاثیر پارامترهای غلظت آمیلوز، غلظت لیمون، زمان فراصوت و اثر متقابل آن‌ها بر اندازه ذرات، پتانسیل زتا و گرانی

گرانی		پتانسیل زتا		اندازه ذرات		
شاخص F	شاخص p	شاخص F	شاخص p	شاخص F	شاخص p	
13/46	0/005	161/23	0/001	46/35	0/001	غلظت آمیلوز
5/41	0/045	5/14	0/051	2/35	0/160	غلظت لیمون
12/93	0/006	3/95	0/078	31/70	0/001	زمان فراصوت
0/86	0/379	10/25	0/023	1/55	0/245	آمیلوز* لیمون
0/33	0/580	1/41	0/266	4/23	0/070	آمیلوز* زمان
5/48	0/044	0/54	0/482	1/68	0/227	لیمون* زمان

لینولئیک اسید مقادیر پتانسیل زتا را به دست آوردند. مقدار این شاخص قبل از اعمال تنش فراصوت 10- میلی ولت بود که بیانگر عدم پایداری سیستم می‌باشد. با اعمال تنش فراصوت مقدار پتانسیل زتا به 27- میلی‌ولت افزایش پیدا کرد که به نسبت پایداری بیشتری را برای سیستم فراهم نموده و قابلیت نگهداری را افزایش می‌دهد. همچنین Eid و همکاران (2013) مقدار پتانسیل زتای تیمارهای مختلف نانوامولسیون روغن زیتون در مونواسترات‌های سوکرز را 28- تا 42- به دست آوردند و نمونه‌های با مقدار پتانسیل زتای بیش از 30- را پایدار ارزیابی کردند. Hasanvand و همکاران (2015) نیز میزان پتانسیل زتای نانوذرات آمیلوز به دست آمده از نشاسته ذرت با آمیلوز بالا که تحت تاثیر تنش فراصوت تولید گردیدند را در محدوده 10- تا 45- عنوان کرده‌اند که نتایج مشابهی با پژوهش حاضر می‌باشد.

تأثیر متقابل آمیلوز با لیمون برخلاف دیگر اثرات متقابل معنادار شده است ($F=10/25$) که این امر می‌تواند بیانگر تأثیر و اهمیت غلظت این دو ماده در به دام افتادن این عامل‌های لیپوفیل در درون زنجیره‌های آمیلوز باشد (Immel and Lichtenthaler, 2000). همچنین افزایش زمان اعمال تیمار فراصوت در تیمارهای مشابه از نظر غلظت آمیلوز و لیمون باعث افت پتانسیل زتا شد که می‌توان آن را با میزان تجمع نانوذرات و افزایش اندازه آن‌ها با افزایش زمان فراصوت مرتبط دانست (شکل 1). این افزایش اندازه می‌تواند باعث پوشیده شدن عوامل فعال سطحی آمیلوز و کاهش پتانسیل زتا شود. با این وجود تأثیر زمان اعمال تنش فراصوت اثر معناداری بر شاخص پتانسیل زتا نداشته و نتوانست اختلاف در سطح 95 درصد را موجب شود (جدول 2). Seo و همکاران (2016) برای ارزیابی تاثیر اعمال تنش فراصوت بر پایداری مخلوط آبی نشاسته با آمیلوز بالا و

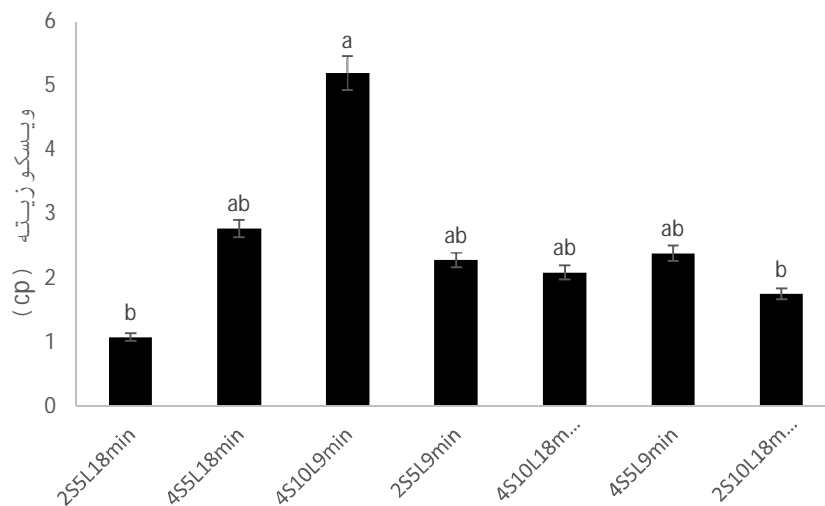


شکل 3- پتانسیل زتا امولسیون‌های حاصل از فرمولاسیون‌های مختلف نانوذرات حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنادار در سطح 5 درصد می‌باشد.

گرانروی سوسپانسیون نانوذرات آمیلوز حاوی لیمونن

بیشترین تأثیر بر میزان گرانروی محلول‌های تولیدشده مربوط به غلظت آمیلوز می‌باشد ($F=13/46$). طبیعتاً با افزایش غلظت آمیلوز، میزان گرانروی محلول افزایش پیدا کرده است و از طرفی با اعمال تیمار فراصوت میزان این شاخص کاهش یافته و محلول روان‌تر شده است (شکل 4). به‌عنوان مثال با افزایش زمان تیمار فراصوت در محلول 4 درصد آمیلوز، کاهش 50 درصدی در این شاخص رخ داده است. بیشتر بودن پتانسیل زتا با افزایش زمان اعمال تیمار فراصوت (شکل 3) را می‌توان با این روند کاهش گرانروی در ارتباط دانست. در واقع با افزایش پتانسیل زتا دافعه بین ذرات افزایش یافته و از تجمع ذرات و افزایش گرانروی کاسته می‌شود. در مواردی، افزایش غلظت آمیلوز از 2 به 4 درصد در تیمارهای مشابه باعث افزایش بیش از 60 درصدی میزان گرانروی شده است. همانطور که در شکل 4 مشاهده می‌شود در بین هیچ‌یک از تیمارهای حاوی 4 درصد آمیلوز، اختلاف معنادار میزان گرانروی در سطح 95 درصد مشاهده نمی‌گردد که این امر را می‌توان وابستگی شدید آن به غلظت آمیلوز تلقی کرد. نمونه‌های حاوی 2 درصد آمیلوز قبل از اعمال تیمار فراصوت گرانروی بسیار بالایی را از خود نشان دادند (44/2 cp) که در مقایسه با مقدار 5/2 cp تعیین‌شده برای بالاترین مقدار ثبت‌شده برای تیمارهایی که تحت تنش فراصوت قرار گرفته، بسیار زیاد است و بیانگر تأثیر بسیار زیاد ($F=12/93$) این تنش مکانیکی بر مقدار سیالیت سوسپانسیون‌ها می‌باشد (Gupta et al., 2016). در واقع اثر فرایند فراصوت بر

محلول حاوی آمیلوز، اعمال تنش مکانیکی و حرارتی برای شکستن پیوندهای بین و درون مولکولی که مسئول اصلی گرانروی هستند، می‌باشد (Chang et al., 2017). هرچه غلظت آمیلوز در سیستم بالاتر باشد میزان تأثیر این تنش بر کاهش گرانروی بیشتر خواهد بود. در کنار این مکانیسم که کاهش گرانروی را در پی دارد، مولکول‌های آمیلوز ممکن است در اثر تحمل این تنش مکانیکی دچار بریدگی و شکستگی‌هایی در زنجیره نیز شوند که این امر هم می‌تواند کاهش گرانروی را تشدید کند. با توجه به ماهیت تنش فراصوت که کاهش طول زنجیره به یک مقدار مشخص، اثر تخریبی آن را محدود می‌کند، میزان کاهش ویسکوزیته در ابتدای فرایند اعمال تنش بیشتر از اواخر فرایند است (Czechowska-Biskup et al., 2005). این روند تأثیر تنش فراصوت بر ویسکوزیته در مطالعه‌ای که توسط cheng و همکاران (2010) بر روی محلول ذرت نشاسته صورت گرفته هم مشاهده شده است. Chang و همکاران (2017) برای بررسی تشکیل نانوذرات آمیلوز از تنش فراصوت با توان 100 وات برای فرایند محلول‌های 1، 2 و 3 درصد آمیلوز استفاده کردند. این محققین اعمال تنش فراصوت را باعث کاهش گرانروی محلول آبی آمیلوز ذکر کردند و غلظت آمیلوز و زمان اعمال تنش را از عوامل اصلی موثر بر این روند کاهشی عنوان کردند. Iida و همکاران (2008) نیز کاهش ویسکوزیته‌ی محلول نشاسته پس از اعمال تنش فراصوت را تأیید کرده و آن را به شکستن زنجیره‌های پلیمری مرتبط دانسته‌اند.



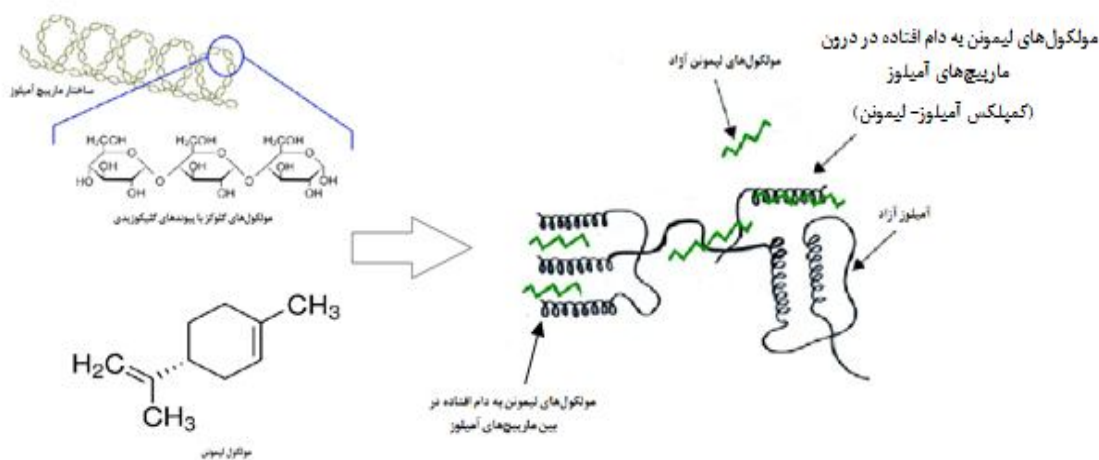
شکل 4- گرانروی امولسیون‌های حاصل از فرمولاسیون‌های مختلف نانوذرات

حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنادار در سطح 5 درصد می‌باشد.

کارایی ریزپوشانی و کارایی بارگیری

مقادیر کارایی ریزپوشانی و کارایی بارگیری تیمارهای مختلف در جدول 3 آورده شده است. همان‌گونه که مشخص است بیشترین تأثیر بر میزان کارایی را غلظت لیمون در فرمولاسیون‌های مختلف داشته است. در تیمارهای مشابه با غلظت 4 درصد آمیلوز و زمان فراصوت 9 دقیقه، با افزایش میزان لیمون از 5 به 10 درصد، کارایی ریزپوشانی از 31 درصد به 82 درصد (رشد 62 درصدی) و کارایی بارگیری از 0/52 درصد به 1/41 درصد (رشد 63 درصدی) افزایش یافته است. Chin و همکاران (2014) در مورد ریزپوشانی کورکومین با نشاسته و همچنین Hasanvand و همکاران (2015) در مورد ریزپوشانی ویتامین D₃ با آمیلوز به نتایج مشابه‌ای دست یافته‌اند. با توجه به معنادار بودن اثر متقابل لیمون و آمیلوز (جدول 4) و از طرفی عدم تغییر معنادار پتانسیل زتا با افزایش مقدار لیمون (شکل 3)، این افزایش کارایی را می‌توان به افزایش شانس به دام افتادن فیزیکی لیمون در غلظت بالاتر آن ارتباط داد. در واقع میزان پیوندهای شیمیایی شکل گرفته بین عوامل سطحی آمیلوز (گروه‌های هیدروکسیل یونیزه شده) و لیمون برای تحت تأثیر قرار دادن بارهای سطحی و دفعه موجود بین ذرات (پتانسیل زتا) در حداقل ممکن می‌باشد و مولکول‌های لیمون در بین و درون مارپیچ‌های آمیلوز به صورت فیزیکی به دام می‌افتند (شکل 5). تمایل حفره‌های آمیلوز به جذب مولکول‌های آبگریز و همچنین دافعه الکترواستاتیک ناشی از عوامل فعال سطحی آمیلوز و از طرفی تنش مکانیکی اعمال شده باعث رانش مولکول‌های لیمون به داخل مارپیچ‌های آمیلوز می‌شود. بر همین اساس در غلظت پایین‌تر آمیلوز (2 درصد) میزان افزایش کارایی ریزپوشانی و کارایی

بارگیری در مقایسه با غلظت 4 درصد آمیلوز، با افزایش غلظت لیمون رشد کمتری را نشان داد (افزایش 29 و 34 درصدی در میزان کارایی ریزپوشانی و بارگیری)، که ناشی از کاهش نیروی دافعه الکترواستاتیکی (شکل 3) برای رانش لیمون به سمت مارپیچ‌های آمیلوز و همچنین شانس کمتر تشکیل این ساختار به دلیل کاهش تعداد حفرات و مارپیچ‌های آمیلوز می‌تواند باشد. محققین زیادی جذب فیزیکی ترکیبات آبگریز به سطح داخلی گرانول‌های نشاسته را یکی از رایج‌ترین پیوندها در محصولات نشاسته‌ای معرفی کرده‌اند که برای محدود کردن رهائش ترکیبات زیست‌فعال در فرایندهای ریزپوشانی مورد استفاده قرار گرفته است (Escher *et al.*, 2000, Kollengode and Hanna, 1997). تشکیل پیوندهای غیرکوالانسی بین ترکیبات معطر و مارپیچ‌های آمیلوز نیز توسط محققین مختلف گزارش شده است (Le Bail *et al.*, 2005, Nuessli *et al.*, 2003, Wulff *et al.*, 1998). در واقع ساختار مارپیچ آمیلوز به‌عنوان یک عملکردی این امکان را به آن می‌دهد که بدون نیاز به پیوند کوالانسی، ترکیبات مختلف را به صورت فیزیکی به دام اندازد (Conde-Petit *et al.*, 2006). تأثیر غلظت لیمون در جدول 4 نیز به وضوح مشخص است و شاخص F بالا بیانگر اهمیت این متغیر در میزان کارایی ریزپوشانی و کارایی بارگیری است (مقادیر F به ترتیب 6084 و 747 برای کارایی ریزپوشانی و کارایی بارگیری). زمان اعمال تنش فراصوت و غلظت آمیلوز به ترتیب در مورد کارایی ریزپوشانی و کارایی بارگیری از دیگر عوامل تأثیرگذار و معنادار در سطح 95 درصد بوده‌اند (جدول 4).



شکل 5- به دام افتادن فیزیکی مولکول‌های لیمون در بین و درون مارپیچ‌های آمیلوز با اعمال نیروهای مکانیکی و الکترواستاتیکی به همراه تمایلات پیوندی آمیلوز

جدول 3- کارایی ریزپوشانی و کارایی بارگیری فرمولاسیون‌های مختلف نانوذرات

فرمولاسیون‌ها	کارایی ریزپوشانی (%)	کارایی بارگیری (%)
4S10L9min	82±1 ^a	1/41±0/2 ^{ab}
4S5L9min	31±1/2 ^f	0/52±0/11 ^{de}
4S10L18min	85±2 ^a	1/63±0/10 ^a
4S5L18min	28±1/3 ^f	0/38±0/03 ^e
2S10L9min	75±1 ^b	1/35±0/09 ^b
2S5L9min	53±1/5 ^d	0/88±0/04 ^c
2S10L18min	64±2 ^c	1/27±0/20 ^b
2S5L18min	38±1 ^e	0/78±0/09 ^{dc}

*حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنادار در سطح 5 درصد می‌باشد.

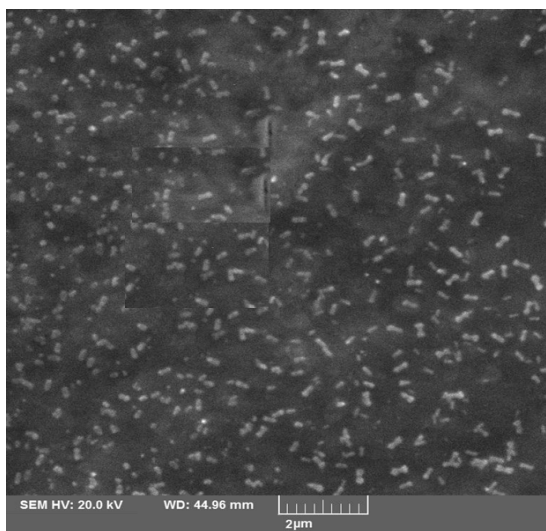
جدول 4- آنالیز واریانس جهت بررسی تاثیر پارامترهای مختلف غلظت آمیلوز، لیمون، زمان فراصوت و اثر متقابل بین آن‌ها بر کارایی ریزپوشانی و

کارایی بارگیری				
کارایی بارگیری		کارایی ریزپوشانی		
شاخص p	شاخص F	شاخص p	شاخص F	
0/015	9	0/295	4	غلظت آمیلوز
0/001	748	0/008	6084	غلظت لیمون
0/401	0/78	0/049	169	زمان فراصوت
0/001	108/04	0/021	900	آمیلوز * لیمون
0/047	5/26	0/049	169	آمیلوز * زمان
0/008	11/25	0/126	25	لیمون * زمان

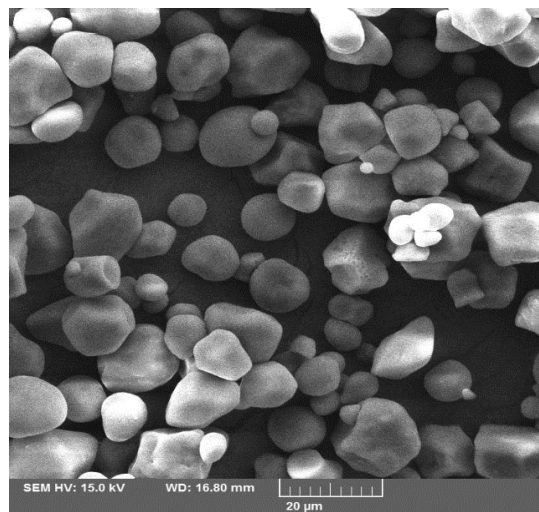
شکستن زنجیره‌های پلیمرها و تخریب مکانیکی گرانول‌های نشاسته فراهم می‌کند. آب نیز در طی فروریختن حباب‌های کایتاسیون به صورت موضعی به رادیکال‌های OH و اتم‌های H تجزیه می‌شود. بعضی از این رادیکال‌های حاصل از شکستن مولکول‌های آب با مواد حل‌شونده واکنش داده و موجب شکستن زنجیره‌های آن‌ها می‌شوند (Czechowska-Biskup *et al.*, 2005). شکل و اندازه گرانول‌های نشاسته بسته به منبع آن‌ها می‌تواند بسیار متنوع باشد (Tester *et al.*, 2008). به‌طور کلی تاثیر فراصوت در رابطه با اصلاح و تغییرات نشاسته مربوط به این واقعیت است که گرانول‌های نشاسته با نیروی کایتاسیونی قابل تغییر هستند. فراصوت در مقایسه با روش‌های دیگر که برای تغییر در ساختار نشاسته در غذاها بکار می‌روند از انرژی بسیار پایین‌تری استفاده می‌کند و حرارت ایجادشده نیز چندان زیاد نیست (Jambrak *et al.*, 2010).

آنالیز مورفولوژی و ریزساختار نانوذرات

تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی روبشی در شکل 6 ارائه شده است. همان‌گونه که در این شکل‌ها مشهود است امواج فراصوت به شدت ساختار و اندازه گرانول‌های نشاسته را تحت تاثیر قرار می‌دهد. اعمال تیمار فراصوت با انرژی کایتاسیونی علاوه بر کاهش شدید اندازه گرانول‌های نشاسته، آنها را به صورت تقریباً یکنواخت در درون سوسپانسیون پراکنده می‌کند (شکل 6 ب). این کاهش اندازه با در سطح قرار دادن عوامل فعال و باردار در ساختار آمیلوز باعث پایداری و یکنواختی بیشتر سوسپانسیون نیز می‌شود. اندازه گرانول‌های نشاسته ذرت در حالت طبیعی بین 21-3 میکرومتر می‌باشد (Horstmann *et al.*, 2017). انرژی حاصل از متلاشی شدن حباب‌های ایجادشده توسط کایتاسیون، با القا یک گرادیان پرفشار و پرسرعت در لایه‌های مایع، نیروی برشی عظیمی را برای



ب



الف

شکل 4- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) گرانول‌های نشاسته قبل از اعمال تنش فراصوت (الف) و نانوذرات آمیلوز حاوی لیمونین بعد از 9 دقیقه تنش فراصوت (ب)

نتیجه‌گیری

افزوده‌شده به محیط، شرایط برای ریزپوشانی ترکیب مورد نظر و تشکیل ساختارهای موسوم به وی‌آمیلوز فراهم می‌شود. تشکیل این ساختارهای مستحکم آمیلوزی باعث افزایش کارایی ریزپوشانی و مقاومت بیشتر این ذرات نانومتری در برابر تنش‌های محیطی می‌شود که می‌تواند آن‌ها را در برابر تنش‌های فرایندی و گوارشی حفظ کرده و ارزش تکنولوژیکی و تغذیه‌ای آن‌ها را افزایش دهد.

اعمال تنش کاویتاسیونی فراصوت در محلول آبی نشاسته حاوی آمیلوز بالا همراه با حرارت می‌تواند گرانول‌های نشاسته را شکسته و به ابعاد نانومتری تبدیل کند. این تنش فیزیکی و اعمال حرارت همزمان ضمن تخریب گرانول‌ها باعث باز شدن زنجیره پلیمرهای خطی نشاسته (آمیلوز) شده و در حضور مواد لیپوفیل موردنظر

منابع

- Anandaraman, S & Reineccius, G., 1986, Stability of encapsulated orange peel oil. *Food technology (USA)*.
- Araújo, M. A., Cunha, A. M & Mota, M., 2004, Enzymatic degradation of starch-based thermoplastic compounds used in prostheses: identification of the degradation products in solution. *Biomaterials*, 25, 2687-2693.
- Barrow, C. J., Nolan, C & Holub, B. J., 2009, Bioequivalence of encapsulated and microencapsulated fish-oil supplementation. *Journal of Functional Foods*, 1, 38-43.
- Bhosale, R. G & Ziegler, G. R., 2010, Preparation of spherulites from amylose-palmitic acid complexes. *Carbohydrate polymers*, 80, 53-64.
- Blanshard, J & Galliard, T., 1987, Starch: Properties and potential. *Wiley & Sons, Great Britain*, 16.
- Chang, Y., Yan, X., Wang, Q., Ren, L., Tong, J & Zhou, J., 2017, Influence of ultrasonic treatment on formation of amylose nanoparticles prepared by nanoprecipitation. *Carbohydrate polymers*, 157, 1413-1418
- Chen, L., Remondetto, G. E & Subirade, M., 2006, Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. *Trends in Food Science & Technology*, 17, 272-283.
- Cheng, W., Chen, J., Liu, D., Ye, X & Ke, F., 2010, Impact of ultrasonic treatment on properties of starch film-forming dispersion and the resulting films. *Carbohydrate Polymers*, 81, 707-711.
- Chin, S. F., Mohd Yazid, S. N. A. & Pang, S. C., 2014, Preparation and characterization of starch nanoparticles for controlled release of curcumin. *International Journal of Polymer Science*, 2014.
- Cohen, R., Orlova, Y., Kovalev, M., Ungar, Y & Shimoni, E., 2008, Structural and functional properties of amylose complexes with genistein. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56, 4212-4218.
- Conde-Petit, B., Escher, F & Nuessli, J., 2006, Structural features of starch-flavor complexation in food model systems. *Trends in food science & technology*, 17, 227-235.
- Czechowska-Biskup, R., Rokita, B., Lotfy, S., Ulanski, P & Rosiak, J. M., 2005, Degradation of chitosan and starch by

- 360-kHz ultrasound. *Carbohydrate Polymers*, 60, 175-184.
- Eid, A. M. M., Elmarzugi, N & El-Enshasy, H. A., 2013, Preparation and evaluation of olive oil nanoemulsion using sucrose monoester. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5, 434-440.
- Elegbede, J. A., Maltzman, T. H., Verma, A. K., Tanner, M. A., Elson, C. E & Gould, M. N., 1986, Mouse skin tumor promoting activity of orange peel oil and d-limonene: a re-evaluation. *Carcinogenesis*, 7, 2047-2049.
- Escher, F., Nuessli, J & Conde-Petit, B., 2000, Interactions of flavor compounds with starch in food processing. ACS Publications.
- Ezhilarasi, P., Karthik, P., Chhanwal, N & Anandharamakrishnan, C., 2013, Nanoencapsulation techniques for food bioactive components: a review. *Food and Bioprocess Technology*, 6, 628-647.
- Fathi, M., Martín, A & McClements, D. J., 2014, Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems. *Trends in food science & technology*, 39, 18-39.
- Gao, F., Zhang, Z., Bu, H., Huang, Y., Gao, Z., Shen, J., Zhao, C & Li, Y., 2011, Nanoemulsion improves the oral absorption of candesartan cilexetil in rats: performance and mechanism. *Journal of controlled release*, 149, 168-174.
- Gallant, D. J., Bouchet, B & Baldwin, P. M., 1997, Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization. *Carbohydrate polymers*, 32, 177-191.
- Gary, L & Jarnagin, R., 1967, Estimation of carrier mobilities. *The Journal of Chemical Physics*, 47, 3084-3085.
- Gökmen, V., Mogol, B. A., Lumaga, R. B., Fogliano, V., Kaplun, Z & Shimoni, E., 2011, Development of functional bread containing nanoencapsulated omega-3 fatty acids. *Journal of Food Engineering*, 105, 585-591.
- Gupta, A., Eral, H. B., Hatton, T. A & Doyle, P. S., 2016, Nanoemulsions: formation, properties and applications. *Soft matter*, 12, 2826-2841.
- Haaj, S. B., Magnin, A., Pétrier, C & Boufi, S., 2013, Starch nanoparticles formation via high power ultrasonication. *Carbohydrate polymers*, 92, 1625-1632.
- Hasanvand, E., Fathi, M., Bassiri, A., Javanmard, M & Abbaszadeh, R., 2015, Novel starch based nanocarrier for vitamin D fortification of milk: Production and characterization. *Food and Bioprocess Technology*, 96, 264-277.
- Heinemann, C., Conde-Petit, B., Nuessli, J & Escher, F., 2001, Evidence of starch inclusion complexation with lactones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1370-1376.
- Heinemann, C., Escher, F & Conde-Petit, B., 2003, Structural features of starch-lactone inclusion complexes in aqueous potato starch dispersions: the role of amylose and amylopectin. *Carbohydrate polymers*, 51, 159-168.
- Helbert, W & Chanzy, H., 1994, Single crystals of V amylose complexed with n-butanol or n-pentanol: structural features and properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 16, 207-213.
- Horstmann, S. W., Lynch, K. M. & Arendt, E. K., 2017, Starch characteristics linked to gluten-free products. *Foods*, 6, 29.
- Iida, Y., Tuziuti, T., Yasui, K., Towata, A & Kozuka, T., 2008, Control of viscosity in starch and polysaccharide solutions with ultrasound after gelatinization. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9, 140-146.
- Immel, S & Lichtenthaler, F. W., 2000, The hydrophobic topographies of amylose and its blue iodine. *Flexible and Rigid Non-glucose Cyclooligosaccharides: Synthesis, Structure, and Properties*, 52, 27.
- Jain, A. K., Khar, R. K., Ahmed, F. J & Diwan, P. V., 2008, Effective insulin delivery using starch nanoparticles as a potential trans-nasal mucoadhesive carrier. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 69, 426-435.
- Jambrak, A. R., Herceg, Z., Šubarić, D., Babić, J., Brnčić, M., Brnčić, S. R., Bosiljkov, T., Čvek, D., Tripalo, B & Gelo, J., 2010, Ultrasound effect on physical properties of corn starch. *Carbohydrate Polymers*, 79, 91-100.
- Jouquand, C., Ducruet, V & Le Bail, P., 2006, Formation of amylose complexes with C6-aroma compounds in starch dispersions and its impact on retention. *Food chemistry*, 96, 461-470.
- Kawasaki, H., Takeda, Y & Arakawa, R., 2007, Mass spectrometric analysis for high molecular weight synthetic polymers using ultrasonic degradation and the mechanism of degradation. *Analytical chemistry*, 79, 4182-4187.
- Khalloufi, S., Corredig, M., Goff, H. D & Alexander, M., 2009, Flaxseed gums and their adsorption on whey protein-stabilized oil-in-water emulsions. *Food hydrocolloids*, 23, 611-618.
- Kim, J.-Y., Park, D.-J & Lim, S. T., 2008, Fragmentation of Waxy Rice Starch Granules by Enzymatic Hydrolysis. *Cereal Chemistry*, 85, 182-187.
- Kollengode, A. N & Hanna, M. A., 1997, Flavor retention in pregelatinized and internally flavored starch extrudates. *Cereal chemistry*, 74, 396-399.
- Kreuter, J., 2007, Nanoparticles-a historical perspective. *International journal of pharmaceutics*, 331, 1-10.
- Lalush, I., Bar, H., Zakaria, I., Eichler, S & Shimoni, E., 2005, Utilization of amylose-lipid complexes as molecular nanocapsules for conjugated linoleic acid. *Biomacromolecules*, 6, 121-130.
- Le Bail, P., Rondeau, C & Buleon, A., 2005, Structural investigation of amylose complexes with small ligands: helical conformation, crystalline structure and thermostability. *International Journal of Biological Macromolecules*, 35, 1-7.
- Lesmes, U., Cohen, S. H., Shener, Y & Shimoni, E., 2009, Effects of long chain fatty acid unsaturation on the structure and controlled release properties of amylose complexes. *Food Hydrocolloids*, 23, 667-675.

- Liu, D., Wu, Q., Chen, H & Chang, P. R., 2009, Transitional properties of starch colloid with particle size reduction from micro-to nanometer. *Journal of Colloid and Interface Science*, 339, 117-124.
- Madene, A., Jacquot, M., Scher, J & Desobry, S., 2006, Flavour encapsulation and controlled release—a review. *International journal of food science & technology*, 41, 1-21.
- Mahdi Jafari, S., He, Y & Bhandari, B., 2006, Nano-emulsion production by sonication and microfluidization—a comparison. *International Journal of Food Properties*, 9, 475-485.
- Marcuse, R., 1984, Fats (lipids) in baking and extrusion. Lipidforum Symposium, Scandinavian Forum for Lipid Research and Technology.
- Marques, A., Reis, R & Hunt, J., 2002, The biocompatibility of novel starch-based polymers and composites: in vitro studies. *Biomaterials*, 23, 1471-1478.
- Mason, T., Paniwnyk, L & Lorimer, J., 1996, The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics sonochemistry*, 3, S253-S260.
- Mohammadinejad, R., Karimi, S., Irvani, S & Varma, R. S., 2016, Plant-derived nanostructures: types and applications. *Green Chemistry*, 18, 20-52.
- Mozafari, M. R., Khosravi-Darani, K., Borazan, G. G., Cui, J., Pardakhty, A & Yurdugul, S., 2008, Encapsulation of food ingredients using nanoliposome technology. *International Journal of Food Properties*, 11, 833-844.
- Nuessli, J., Putaux, J. L., Le Bail, P & Buléon, A., 2003, Crystal structure of amylose complexes with small ligands. *International Journal of Biological Macromolecules*, 33, 227-234.
- Obiro, W. C., Sinha Ray, S & Emmambux, M. N., 2012, V-amylose structural characteristics, methods of preparation, significance, and potential applications. *Food Reviews International*, 28, 412-438.
- Patist, A & Bates, D., 2008, Ultrasonic innovations in the food industry: From the laboratory to commercial production. *Innovative food science & emerging technologies*, 9, 147-154.
- Pretz, C., Hauser, A., Hause, G., Kramer, A & Mäder, K., 2010, Application of atomic force microscopy and ultrasonic resonator technology on nanoscale: distinction of nanoemulsions from nanocapsules. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 39, 141-151.
- Prozorov, T., Prozorov, R & Suslick, K. S., 2004, High velocity interparticle collisions driven by ultrasound. *Journal of the American Chemical Society*, 126, 13890-13891.
- Rabi, T & Bishayee, A., 2009, Terpenoids and breast cancer chemoprevention. *Breast cancer research and treatment*, 115, 223-239.
- Raphael, T & Kuttan, G., 2003, Effect of naturally occurring monoterpenes carvone, limonene and perillic acid in the inhibition of experimental lung metastasis induced by B16F-10 melanoma cells. *Journal of experimental & clinical cancer research: CR*, 22, 419-424.
- Santander-Ortega, M., Stauner, T., Loretz, B., Ortega-Vinuesa, J., Bastos-González, D., Wenz, G., Schaefer, U & Lehr, C., 2010, Nanoparticles made from novel starch derivatives for transdermal drug delivery. *Journal of controlled release*, 141, 85-92.
- Seo, T.-R., Kim, H.-Y & Lim, S.-T., 2016, Preparation and characterization of aqueous dispersions of high amylose starch and conjugated linoleic acid complex. *Food chemistry*, 211, 530-537.
- Simi, C & Abraham, T. E., 2007, Hydrophobic grafted and cross-linked starch nanoparticles for drug delivery. *Bioprocess and biosystems engineering*, 30, 173-180.
- Simunkova, H., Pessenda-Garcia, P., Wosik, J., Angerer, P., Kronberger, H & Nauer, G. E., 2009, The fundamentals of nano- and submicro-scaled ceramic particles incorporation into electrodeposited nickel layers: Zeta potential measurements. *Surface and Coatings Technology*, 203, 1806-1814.
- Telis-Romero, J., Cabral, R. A. F., Gabas, A. L. & Telis, V. R. N., 2001, Rheological properties and fluid dynamics of coffee extract. *Journal of Food Process Engineering*, 24, 217-230.
- Tester, R. F., Yousuf, R., Karkalas, J., Kettlitz, B & Röper, H., 2008, Properties of protease-treated maize starches. *Food chemistry*, 109, 257-263.
- Wooster, T. J., Golding, M & Sanguansri, P., 2008, Impact of oil type on nanoemulsion formation and Ostwald ripening stability. *Langmuir*, 24, 12758-12765.
- Wulff, G., Steinert, A & Höller, O., 1998, Modification of amylose and investigation of its inclusion behavior. *Carbohydrate Research*, 307, 19-31.
- Xiao, S., Tong, C., Liu, X., Yu, D., Liu, Q., Xue, C., Tang, D & Zhao, L., 2006, Preparation of folate-conjugated starch nanoparticles and its application to tumor-targeted drug delivery vector. *Chinese Science Bulletin*, 51, 1693-1697.
- Ye, A., Flanagan, J & Singh, H., 2006, Formation of stable nanoparticles via electrostatic complexation between sodium caseinate and gum arabic. *Biopolymers*, 82, 121-133.
- Yu, D., Xiao, S., Tong, C., Chen, L & Liu, X., 2007, Dialdehyde starch nanoparticles: Preparation and application in drug carrier. *Chinese Science Bulletin*, 52, 2913-2918.

Nanoencapsulation of limonene in amylose structure with Thermo-mechanical (Ultrasound) stress

M. Ganjeh¹, S. M. Jafari^{2*}, M. Niakosari³, A. M. Tamadon⁴, Y. Maghsoudlo⁵

Received: 2017.06.02

Accepted: 2017.08.26

Introduction: In recent years, production of nutraceuticals by adding bioactive compounds and nutrients has been grown substantially. These compounds are generally sensitive to environmental or gastrointestinal conditions and their bioavailability is limited due to destructive reactions. One of the common methods to reduce or prevent these kind of problems, is microencapsulation of valuable compounds in some materials which can protect them against environmental conditions, and enabling them to controlled release from trapped compounds at specific time and place. Orange peel oil, contains some important bioactive compounds such as limonene that is used in a variety of beverages, foods, cosmetics, pharmaceuticals and chemicals. D-limonene is the main constituent of orange peel oil, because it makes an 80-95% fraction of the orange peel oil volatile compounds, depending on fruit variety. In addition to its technological characteristics (flavor), D limonene can stop or delay the initiation of cancer. It can also be used as a safe alternative to antimicrobial compounds. Nevertheless, technological limitations (hydrophobic structure, high reactivity, sensitivity to oxidation and volatility) often avoid suitable use of this compound as a dietary supplement. Polysaccharides are among of the basic materials which are applied more in this field. Several factors such as cheap and easy access, having active groups interacting with hydrophobic and hydrophilic compounds, biodegradation, biocompatibility and relatively high thermal resistance, have turned them to be superior to lipid and protein carriers. One of the most important polysaccharide compounds existing in nature, is starch. It can be used as a carrier in encapsulation processes with different purposes, having advantages such as inexpensive, non-toxic, capable of recrystallization, the ability to form film and complex and resistant to various degrees of enzymatic hydrolysis. Spatial configuration of amylose is changed in the presence of ligands such as iodine and linear alcohols, resulting in a left-handed helix which can trap ligands within or between curvatures derived from glucose connections. One of the major structures which is created in the interaction of amylose and lipophilic substances, is known as V-amylose structure. V-amylose is a left-handed helix with an inner hole which ligands can be placed within it. The aim of this study was to determine the effectiveness of amylose in nanoencapsulation of limonene as a bioactive compound with desirable sensory characteristics using a thermo-mechanical stress.

Materials and methods: Based on the analysis of pure limonene samples (Sigma-Aldrich) as well as samples used in this study, more than 92% of examined sample comprised of D-limonene. In order to prepare amylose nanoparticles containing limonene, 0.1 molar solution of potassium hydroxide (Merck, Germany) was prepared in deionized water and then high amylose corn starch (HACS) (Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) with 70% amylose was added to it in the ratios of 2: 4% while stirring continuously for 30 minutes at 80°C. Limonene was then used in the ratios of 5: 10% of HACS was added to the suspension and stirring continued for 1 minute. Initial suspension has been processed by using ultrasound system (Model UP100- Hescheler Company, Germany) with 100 W power and frequency of 30 kHz for 9 and 18 minutes. The viscosity of amylose suspensions containing nanoparticles with different formulations was measured by using a capillary viscometer (Schott-Gerate-Capillary-Viscometer-525-00- Germany). Size and zeta potential was measured by using dynamic light scattering (DLS) and Nanotracs Flex In-situ Particle Size Analyzer devices and Microtracs ZETA-check determined. The morphology of nanoparticles was studied using a scanning electron microscopy

1. Ph.D. student of Food Materials and Process Design Engineering, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
 2. Associate Professor, Department of Food Materials and Process Design Engineering, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
 3. Professor, Faculty of food science, Agriculture College of Shiraz University
 4. Associate Professor, Department of Pharmaceutical Biotechnology, Shiraz University of Medical Sciences
 5. Professor, Department of Food science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
- (*Corresponding Author Email: smjafari@gau.ac.ir)

(TESCAN-Vega3- Czech Republic). Microencapsulation efficiency and loading efficiency were determined by using spectrophotometry.

Results and Discussion: In all formulations, particle size were less than 50 nm. Starch granules were exposed to cavitation stress by applying the ultrasonic process. The constant formation of bubbles creates a mechanical impact with high energy on starch granules during bursting. Fast impingement of fluid to granule surfaces, hitting particles to each other as well as resistant of the granules against fluid stream cause breaking of starch particles into nanoparticle scales. The highest amount of zeta potential was related to the sample which had the highest starch and limonene concentration. Amylose concentration had the main effect on zeta potential changes. Electrostatic charges can be the main reasons for the higher zeta potential in samples with 4% amylose concentration. More increasing in surface active agents of amylose, namely ionized hydroxyl groups of glucose molecules leads to increasing in surface charge, and results in zeta potential. The most impact on solutions viscosity is related to amylose concentration. Generally, increasing the amylose concentration leads to increasing the solution viscosity, in other side, with ultrasound treatment, the amount of this index was reduced and the solution became more fluent. Microencapsulation and loading efficiency values ranged between 28-82% and 0.38-1.63% respectively. The limonene concentration had the most impact on the efficiency in various formulations. At similar treatments with %4 amylose concentration and 9 min sonication period, by increasing the amount of limonene from %5 to 10, microencapsulation and loading efficiency were increased from %31 to %82 (%62 growth) and from 0.52 to 1.41 (%63 growth) respectively.

Keywords: Nanoencapsulation, Limonene, Amylose, Ultrasound, Nanoparticle, Starch