

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشکده کشاورزی

رشته مهندسی کشاورزی گرایش علوم مواد غذایی

پایان نامه کارشناسی ارشد

درون پوشانی روغن *Mortierella alpina* و بررسی پایداری فیزیکی شیمیایی آن

نگارنده: مرجان اسفندیاری مهنی

استاد راهنما:

دکتر حمیدرضا صمدلوئی

استاد مشاور:

دکتر احمد رجایی

تیر ۱۳۹۸

سپاس و ستایش مرخدای را جل و جلاله که آثار قدرت او بر چهره روز روشن، تابان است و انوار حکمت او در دل  
شب تار، در قشبان. آفریدگاری که خویشتن را به ما شناساند و درهای علم را بر ما گشود و عمری و فرصتی عطا فرمود تا بدان،  
بنده ضعیف خویش را در طریق علم و معرفت یازماید.

تقدیم به

روح آسمانی پدرم که عالمانه به من آموخت تا چگونه در عرصه زندگی، ایستادگی را تجربه نمایم.  
و مقدسترین واژه مادر لغت نامه دلم، مادر مهربانم که زندگیم را دیون مهر و عطف آن می دانم.

باتقدیر و تشکر از:

استاد فرهیخته و فرزانه جناب آقای دکتر حمید رضا صد لویی که با نکته های دلاویز و گفته های بلند، صحیفه های سخن را علم پرور نمود و همواره راهنما و راهنمای من در اتمام و تکمیل این پایان نامه بوده است.

از استاد گرامی ام جناب آقای دکتر احمد رجایی بسیار سپاسگزارم چرا که بدون یاری ها و مشاوره های بی چشم داشت ایشان انجام این پایان نامه بسیار مشکل مینمود.

## تعهد نامه

اینجانب **مرجان اسفندیاری مهنی** دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته مهندسی علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه **درون پوشانی روغن *Mortierella alpina* و بررسی پایداری فیزیکی شیمیایی آن** تحت راهنمایی **دکتر حمیدرضا صمدلوئی** متعهد می شوم .

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است .
- در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است .
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است .
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه صنعتی شاهرود » و یا « Shahrood University of Technology » به چاپ خواهد رسید .
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنده ( یا بافتهای آنها ) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است .
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری ، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است .

تاریخ

امضای دانشجو

### مالکیت نتایج و حق نشر

کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج ، کتاب ، برنامه های رایانه ای ، نرم افزار ها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد . این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود.

استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.

## چکیده

هدف از این پژوهش درونپوشانی روغن مورتیرا آلپینا پایدار با استفاده از نانوذله کیتوزان و بررسی تأثیر درونپوشانی بر پایداری اکسیداتیو روغن مورتیرا آلپینا بود. نتایج آزمون کروماتوگرافی گازی نشان داد که حدود ۴۲٪ روغن مورتیرا آلپینا از آراشیدونیک اسید که یک اسید چرب ۲۰ کربنه با ۴ پیوند غیر اشباع است، تشکیل شده است. نتایج حاصل از طیف FT-IR تشکیل پیوند بین کیتوزان و کاپریک اسید و استتاریک اسید را تأیید کرد. نتایج عکس‌های میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان داد که با اضافه شدن استتاریک اسید و کاپریک اسید به زنجیرهای کیتوزان تشکیل نانو ذرات بهتر شد و همچنین تشکیل نانو ذرات کیتوزان-استتاریک اسید در مقایسه با کیتوزان-کاپریک اسید بهبود یافت. در ادامه اثر کیتوزان اصلاح نشده، استتاریک اسید و کاپریک اسید بر اندازه قطرات روغن و پایداری امولسیون پیکرینگ روغن مورتیرا آلپینا در سه ساعت و هفت روز پس از تولید بررسی شد. نتایج نشان داد اختلاف معنی داری در سطح ۵٪ بین کیتوزان، نانوذله‌های کیتوزان-استتاریک اسید و کیتوزان-کاپریک اسید از نظر اندازه ذرات مشاهده نشد. در ادامه پایداری اکسیداتیو امولسیون پیکرینگ روغن مورتیرا آلپینا به مدت ۲۰ روز در دمای محیط با استفاده از آزمون پراکسید بررسی شد. نتایج نشان داد که امولسیون تولید شده توسط نانوذله کیتوزان-استتاریک اسید، بیشترین پایداری اکسیداتیو را داشت. نتایج آزمون رئولوژی نشان داد که در نمونه امولسیون پیکرینگ با کیتوزان اصلاح نشده در فرکانس‌های اعمال شده، رفتار ویسکوز بر رفتار الاستیک غالب شد و رفتار الاستیک نمونه امولسیون تهیه شده با نانوذله کیتوزان-استتاریک اسید اندکی بیشتر از امولسیون تهیه شده با نانوذله کیتوزان-کاپریک اسید بود. نتایج اندازه‌گیری زاویه تماس نشان داد نمونه امولسیون پودر شده کیتوزان-استتاریک اسید بیشترین زاویه تماس و کمترین جذب آب نسبت به نمونه‌های دیگر داشت.

**کلید واژه‌ها:** روغن مورتیرا آلپینا، امولسیون پیکرینگ، نانوذله کیتوزان، پایداری اکسیداتیو

## فهرست مطالب

فصل اول	۱
کلیات	۱
۱-۱ مقدمه	۲
۲-۱ تاریخچه تولید روغن تک یاخته	۴
۳-۱ آراشیدونیک اسید	۷
۴-۱ اسیدهای چرب ضروری	۹
۵-۱ تشکیل اسیدهای چرب غیر اشباع	۱۰
۱-۵-۱ نقش اسیدهای چرب غیر اشباع با چند پیوند دوگانه در سلامت	۱۳
۶-۱ مورتیرا آلپینا	۱۴
۱-۶-۱ مزایای قارچ مورتیرا آلپینا	۱۴
۷-۱ مکانیسم تجمع و تولید اسیدهای چرب توسط میکروارگانیسم های روغنی	۱۵
۸-۱ لیپیدها	۱۷
۹-۱ مسیر بیو سنتز اسیدهای چرب چند غیر اشباع در مورتیرا آلپینا	۱۸
۱۰-۱ بیوشیمی تجمع روغن	۲۰
۱۱-۱ عوامل موثر بر تولید آراشیدونیک اسید	۲۷
۱-۱۱-۱ منبع کربن	۲۷
۲-۱۱-۱ منابع نیتروژنی	۲۸
۳-۱۱-۱ غلظت اکسیژن محلول	۲۹
۴-۱۱-۱ pH	۳۰
۵-۱۱-۱ دما	۳۰
۶-۱۱-۱ مدت زمان تخمیر	۳۱
۱۲-۱ درونپوشانی ترکیبات زیست فعال	۳۱
۱-۱۲-۱ دلایل استفاده از کپسوله سازی در صنایع غذایی	۳۲
۲-۱۲-۱ مواد کپسول سازی و هدف	۳۲
۱۳-۱ نانوانکپسولاسیون در صنایع غذایی	۳۳
۱۴-۱ امولسیون	۳۴
۱۵-۱ نانوامولسیون ها	۳۶

۳۶.....	۱-۱۵-۱ تعریف و ساختار شیمیایی نانوامولسیون ها.....
۳۷.....	۱۶-۱ اکسیداسیون.....
۳۸.....	۱۷-۱ نانوذله.....
۳۹.....	۱۸-۱ کیتوزان.....
۴۰.....	۱-۱۸-۱ توانایی کیتوزان به عنوان امولسیفایر.....
۴۰.....	۱۹-۱ کاپریک اسید.....
۴۱.....	۲۰-۱ استئاریک اسید.....
۴۱.....	۲۱-۱ امولسیون پیکرینگ.....
۴۳.....	۲۲-۱ تعاملات کلئیدی.....
۴۳.....	۱-۲۲-۱ نیروی استریک.....
۴۳.....	۲-۲۲-۱ نیروی هیدراتاسیون.....
۴۴.....	۲۳-۱ رئولوژی.....
۴۴.....	۱-۲۳-۱ طبقه بندی مواد از لحاظ رئولوژی.....
۴۵.....	۲۴-۱ زاویه تماس.....
۴۷.....	فصل دوم.....
۴۷.....	مروری بر مطالعات پیشین.....
۴۸.....	۱-۲ کارهای انجام گرفته بر روی مورتیرا آلیپنا.....
۵۲.....	۲-۲ مروری بر پژوهش های درونپوشانی و اکسیداسیون.....
۵۶.....	۳-۲ مروری بر پژوهش های امولسیون پیکرینگ و پایداری آن.....
۵۷.....	۴-۲ مروری بر پژوهش های رئولوژی و زاویه تماس.....
۶۱.....	فصل سوم.....
۶۱.....	مواد و روش ها.....
۶۲.....	۱-۳ مواد اولیه مورد استفاده.....
۶۲.....	۲-۳ تجهیزات مورد استفاده.....
۶۳.....	۳-۳ روش ها.....
۶۳.....	۱-۳-۳ روش نگهداری میکروارگانیزم ها.....
۶۳.....	۲-۳-۳ مایه تلقیح و کشت های اصلی.....
۶۴.....	۱-۲-۳-۳ تهیه محیط کشت توسعه تلقیح.....



۶۴	.....محیط کشت تولید محصول.....	۲-۲-۳-۳
۶۴	.....استخراج توده زیستی.....	۳-۳-۳
۶۵	.....اندازه گیری وزن خشک سلولی.....	۴-۳-۳
۶۵	.....استخراج لیپید.....	۵-۳-۳
۶۶	.....مشتق سازی اسیدهای چرب.....	۶-۳-۳
۶۷	.....آماده سازی نانوژل کیتوزان-استئاریک اسید و کیتوزان-کاپریک اسید.....	۷-۳-۳
۶۸	.....بررسی نانوژل کیتوزان.....	۸-۳-۳
۶۸	.....آزمون FT-IR.....	۱-۸-۳-۳
۶۹	.....آزمون میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی (FE-SEM).....	۲-۸-۳-۳
۶۹	.....آماده سازی امولسیون های پیکرینگ.....	۹-۳-۳
۷۰	.....بررسی پایداری امولسیون پیکرینگ.....	۱۰-۳-۳
۷۰	.....تعیین اندازه ذرات.....	۱-۱۰-۳-۳
۷۰	.....محاسبه ضریب خامه ای شدن (Creaming test).....	۲-۱۰-۳-۳
۷۱	.....تعیین ویژگی های رئولوژیکی.....	۱۱-۳-۳
۷۲	.....ارزیابی پایداری اکسیداتیو با آزمون پراکسید.....	۱۲-۳-۳
۷۳	.....انحلال پذیری ذرات.....	۱۳-۳-۳
۷۴	.....تجزیه تحلیل داده ها.....	۱۴-۳-۳
۷۵	.....فصل چهارم.....	
۷۵	.....بحث و نتایج.....	
۷۶	.....تعیین پروفایل اسیدهای چرب روغن مورتیرالا آلیپنا.....	۱-۴
۷۷	.....بررسی نانوژل.....	۲-۴
۷۷	.....نتایج FT-IR.....	۱-۲-۴
۸۱	.....بررسی ساختار نانوژل ها توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی (FE-SEM).....	۲-۲-۴
۸۳	.....بررسی پایداری امولسیون پیکرینگ.....	۳-۴
۸۳	.....شاخص خامه ای شدن.....	۱-۳-۴
	.....بررسی پایداری و میانگین اندازه ذرات امولسیون پیکرینگ روغن مورتیرالا آلیپنا پایدار شده با کیتوزان، نانوژل کیتوزان-استئاریک اسید و نانوژل کیتوزان-کاپریک اسید.....	۲-۳-۴
۸۶	.....	
۸۸	.....اندازه گیری پایداری اکسیداتیو.....	۴-۴

۹۲.....	۴-۵ آزمون رتولوژی نمونه های کیتوزان، نانوژل های کیتوزان-استتاریک اسید و کیتوزان-کاپریک اسید.....
۹۶.....	۴-۶ اندازه گیری انحلال پذیری امولسیون پودری .....
۹۸.....	نتیجه گیری.....
۹۹.....	پیشنهادات.....
۱۰۰.....	منابع.....

## فهرست اشکال

- شکل ۱-۱: مسیر متابولیکی تشکیل اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه ..... ۱۱
- شکل ۲-۱: نمایش شماتیکی فرآیند تجمع لیپید در میکروارگانسیم های روغنی ..... ۱۶
- شکل ۳-۱: ساختمان مولکول تری آسیل گلیسرول ..... ۱۸
- شکل ۴-۱: مسیر کلی تولید زیستی اسیدهای چرب در مورتیرالا آلپینا 1S-4 و جهش های آن ..... ۲۰
- شکل ۵-۱: نمودار چگونگی فعالیت چرخه سترات/مالات و چرخه ترانس هیدروژناز سیتوزولی ..... ۲۴
- شکل ۶-۱: نمودار روند پیشنهادی برای تولید زیستی لیپیدهای میکروبی ..... ۲۶
- شکل ۷-۱: تصویر شماتیکی یک امولسیون معمولی روغن در آب (بر پایه سورفکتانت) و یک امولسیون پیکرینگ روغن در آب ..... ۴۲
- شکل ۱-۳: توده زیستی ..... ۶۵
- شکل ۲-۳: دستگاه سانتریفوژ ..... ۶۶
- شکل ۳-۳: دستگاه طیف سنجی مادون قرمز، FT-IR ..... ۶۸
- شکل ۴-۳: میکروسکوپ نوری ..... ۷۰
- شکل ۵-۳: دستگاه رئومتر ..... ۷۲
- شکل ۶-۳: اسپکتروفتومتر نور مرئی ..... ۷۳
- شکل ۱-۴: طیف های FT-IR مربوط به الف: کیتوزان، ب: استتاریک اسید، ج: کاپریک اسید، د: نانوذله کیتوزان- استتاریک اسید و: نانوذله کیتوزان-کاپریک اسید ..... ۷۹
- شکل ۲-۴: عکس میکروسکوپ الکترونی روبشی کیتوزان (الف)، نانوذله کیتوزان-کاپریک اسید (ب) و نانوذله کیتوزان- استتاریک اسید (ج) ..... ۸۲
- شکل ۳-۴: عکس دیجیتالی نمونه های امولسیون پیکرینگ کیتوزان، نانوذله کیتوزان-کاپریک اسید و کیتوزان- استتاریک اسید پس از ۷ روز نگهداری در دمای اتاق ..... ۸۴
- شکل ۴-۴: درصد خامه ای شدن امولسیون پیکرینگ کیتوزان، کیتوزان-استتاریک اسید و کیتوزان-کاپریک اسید بعد از ۷ روز نگهداری در دمای اتاق. حروف لاتین نشان دهنده سطح معنی داری در سطح ۵٪ است ..... ۸۵
- شکل ۴-۵: تصاویر میکروسکوپ نوری امولسیون پیکرینگ پایدار شده با کیتوزان، نانوذله کیتوزان-استتاریک اسید و کیتوزان-کاپریک اسید، روز اول ..... ۸۶
- شکل ۴-۶: میانگین اندازه ذرات امولسیون پیکرینگ پایدار شده با کیتوزان، نانوذله کیتوزان-کاپریک اسید و کیتوزان- استتاریک اسید، روز اول. حروف لاتین نشان دهنده سطح معنی داری در سطح ۵٪ است ..... ۸۷
- شکل ۴-۷: نمودار میانگین و انحراف معیار مقادیر پراکسید تیمارهای مختلف در روزهای ۱، ۵، ۸، ۱۳ و ۲۰ نگهداری شده در دمای محیط ..... ۸۹
- شکل ۴-۸: تست رئولوژی (G' و G'')، الف: کیتوزان، ب: کیتوزان-استتاریک اسید ج: کیتوزان-کاپریک اسید ..... ۹۳
- شکل ۴-۹: میزان انحلال پذیری نمونه های امولسیون پودری کیتوزان (الف)، کیتوزان-اسید استتاریک (ب) و کیتوزان- کاپریک اسید (ج) ..... ۹۶

## فهرست جداول

- جدول ۱-۱: ترکیب اسیدهای چرب روغن تک یاخته معادل‌های کره کاکائو..... ۶
- جدول ۱-۲: تولید آراشیدونیک اسید توسط گونه‌های مختلف مورتیرا..... ۱۹
- جدول ۴-۱: پروفایل و درصد اسیدهای چرب روغن مورتیرا آلپینا..... ۷۷

# فصل اول

## کلیات

استفاده از میکروارگانیسم ها به منظور تولید محصول به دوران باستان باز می گردد. قارچ ها اولین میکروارگانیسم هایی بودند که بشر به منظور تولید محصول از آن ها استفاده کرد و تولید الکل توسط گونه های قارچی اولین فعالیت بیوتکنولوژی بشر بود. استفاده از مخمر ها برای تخمیر و ورآمدن نان نیز قدمتی طولانی دارد. با پیشرفت تکنولوژی و با بررسی بیشتر محصولات میکروارگانیسم ها، به وسعت و اهمیت تولیدات میکروارگانیسمی بیشتری پی برده شد. در بین محصولات میکروارگانیسمی، اندکی نیست که پی به اهمیت روغن تک یاخته برده شد و تحقیقات فراوانی برای تولید این محصول صورت گرفته است (Hayes and Nair, 1987). در تحقیقی که Roland و همکاران در سال ۲۰۰۳ انجام شد نشان دادند که روغن منبع انرژی مورد استفاده از میکروارگانیسم در مواقع کمبود انرژی است به عنوان مثال می توان به تجزیه روغن در اسپور به منظور رشد و جوانه زنی ریشه اشاره کرد. گونه های که می توانند بیشتر از ۲۰٪ وزن خشک توده زیستی شان روغن تولید کنند معروف به میکروارگانیسم های oleaginous می باشند (Dyal and Narine, 2005; Ratledge, 2004). اسیدهای چرب غیراشباع روغن های ریزسازواره ای بدلیل عملکردهای ارزشمندشان مورد توجه زیادی قرار گرفته اند.

آراشیدونیک اسید<sup>۱</sup>(ARA) یک اسید چرب ضروری در تغذیه ی انسان و ماده پیشساز مواد فعال زیستی، پروستاگالاندین ها<sup>۲</sup>، لوکوترین ها<sup>۳</sup>، ترومبوکسان و پروستاگلین ها است. این اسید فراوانترین اسیدچرب ۲۰کربنه (C<sub>20</sub>) چندغیراشباعی<sup>۴</sup>(کلاس ω-6) در انسان می باشد همچنین این اسید چرب کاربرد وسیعی در پزشکی، داروسازی، مواد آرایشی، صنایع غذایی و کشاورزی دارد (Ji et al., 2014). علاوه بر نقش های مختلف فیزیولوژیک، آراشیدونیک اسید برای تغذیه ی نوزادان نیز ضروری است، زیرا

<sup>1</sup>-Single cell oil (SCO)

<sup>2</sup>- Arachidonic acid: 5, 8, 11, 14- cis-ecosatetraenoic acid

<sup>3</sup>- Prostaglandins

<sup>4</sup> Leukotrienes

<sup>5</sup>- Polyunsaturated fatty acids

همراه با دوکوزاهگزانوئیک اسید، نقش مهمی در توسعه ی مغز نوزادان بازی می کند ( Hwang et al., 2005). گونه‌هایی از قارچ رشته‌ای مورتیرا می‌توانند بیش از ۴۰٪ چربی در خود ذخیره کنند که بیشتر از ۴۰٪ این میزان را آراشیدونیک اسید تشکیل می‌دهد ( Kavadia et al., 2001; Kawashima et al., 2000).

با توجه به اینکه کبد حیوانات مخصوصاً کبد خوک، روغن ماهی، زرده تخم مرغ، غدد فوق کلیوی منابع معمول آراشیدونیک اسید هستند (Li et al., 2015)، اما به دلیل اینکه دارای مقادیر کمی اسیدچرب هستند، قادر به پاسخگویی به این نیاز نیستند. بنابراین، ضرورت یافتن یک منبع غنی احساس می شود (Gill and Valivety, 1997). امروزه روغن تک یاخته به دلیل شباهت ساختار اسیدهای چرب با آنچه در گیاهان یافت می شود، به عنوان یک منبع بالقوه تولید لیپید مورد توجه قرار گرفته است ( Hwang et al., 2005). قارچ های رشته ای متعلق به جنس مورتیرا به عنوان پروتئین امید بخش برای تولید ARA، شناخته شده اند به ویژه مورتیرا آلپینا که می تواند مقادیر قابل توجهی از ARA را در میسلایوم خود جمع آوری کند (Li et al., 2015).

بعضی از جنس های قارچ رشته ای، به طور عمده *Mucor*, *Cunninghamella*, *Mortierella*, *Pythium* و *Thraustochytrium* به عنوان تولید کننده خوب اسید های چرب غیر اشباع گزارش شده است (Certik et al., 2006). بسیاری از مطالعات از اثرات مفید اسیدهای چرب غیر اشباع رژیم در جلوگیری از بیماری های التهابی مانند سرطان و بیماری های قلبی عروقی و عملکرد طبیعی مغز حمایت می کنند (Wang et al., 2018). از مهمترین نکات مورد توجه برای تولید محصول روغنی از گونه های قارچی تهیه روغنی با مدت ماندگاری بالا می باشد. با در نظر گرفتن محتوی بالای آراشیدونیک اسید روغن مورتیرا این گونه روغنی شرایط فساد اکسیداتیو را داشته و در عین حال با در نظر گرفتن این نکته که روغن این گونه مورد نیاز کارخانه جات غذای کودک می باشد تهیه پودر این روغن مورد توجه دانشمندان بوده است. اسیدهای چرب چند غیراشباعی 3- $\omega$  اصولاً بدون مزه هستند،

---

<sup>1</sup>- DHA (docosahexaenoic acid)

ولی در اثر اکسایش، محصولات غنی شده طعم نامطبوعی پیدا می‌کنند. آستانه‌ی طعمی برای این ترکیبات فرآر، بسیار پایین است و در غلظت‌های بسیار پایین (در حد ppt و ppb) قابل تشخیص هستند (Sheikhshoei et al., 2013). در ضمن، تشکیل رادیکال‌های آزاد فعال (واکنش پذیر) در طول فرآیند اکسایش افزایش ابتلا به بیماری‌های قلبی عروقی را به دنبال دارد. از جمله مهم‌ترین فرآورده‌های اکسیداسیون خودبخودی لیپیدها، هیدروپرواکسیدها می‌باشند که خودشان فاقد طعم و بو هستند ولی فرآورده‌های حاصل از تجزیه آن‌ها نظیر آلدئیدها و کتون‌ها می‌توانند تأثیر زیادی روی طعم و بوی ماده غذایی داشته باشند (Freitas et al., 2015). با توجه به مطالب عنوان شده، تلاش شد با بررسی اثر کپسوله کردن اسیدهای چرب غیر اشباع بلند زنجیره برای غلبه بر اکسیداسیون آن‌ها استفاده گردد؛ راهکار مناسب برای غلبه بر اکسیداسیون این اسیدهای چرب درون‌پوشانی آن‌ها است.

## ۱-۲ تاریخچه تولید روغن تک یاخته

علاقه زیادی برای تولید لیپیدهای میکروبی در طی ۱۲۵ سال گذشته و بهره‌برداری از آن‌ها به عنوان منابع جایگزین روغن‌ها و چربی‌ها برای مصرف بشر احتمالاً از سال‌های اولیه قرن بیستم وجود داشته است. به نظر می‌رسد پول لیندر<sup>۱</sup> که در برلین آلمان فعالیت می‌کرد اولین کسی باشد که یک فرآیند در مقیاس کوچک برای تولید چربی با استفاده از گونه مخمر اندومایسس ورنالیس<sup>۲</sup> که در حال حاضر به عنوان تریکوسپورون پولاولانس<sup>۳</sup> شناخته می‌شود، توسعه داده باشد (Ratledge, 2005).

توسعه تولید کارآمد و در مقیاس زیاد روغن‌های میکروبی بدلیل نبود فرمانتورهای بزرگ مناسب برای تولید توده زیستی با دانسیته زیاد (بیش از ۵۰ g/l) کاهش یافت. تقریباً تا دهه ۱۹۵۰ میلادی فرمانتورهای آزمایشگاهی ساخته نشده بودند و فرمانتورهای صنعتی دارای همزن<sup>۴</sup> نیز بسیار کم بودند. توسعه فرآیندهای تخمیر غوطه‌وری برای تولید پروتئین تک یاخته در اواخر دهه ۱۹۵۰ میلادی موجب تولید

---

<sup>1</sup>- Paul Linder

<sup>2</sup>- *Endomyces vernalis*

<sup>3</sup>- *Trichosporon pullulans*

<sup>4</sup>- Industrial-scale stirred tank fermenters



فرمانتورهای صنعتی همزن‌دار شد، بار دیگر تولید روغن های میکروبی در اواسط دهه ۱۹۶۰ میلادی مورد توجه قرار گرفت. اگرچه علاقه برای تولید اینگونه محصولات بدلیل اینکه روغن های گیاهی بسیار ارزان شده بودند، به مقدار زیادی از بین رفت و احتمال کمی می رفت که بتوان هر گونه چشم انداز خوبی برای روغن های تولیدی از سایر منابع که بتوان با روغن های گیاهی از لحاظ قیمت رقابت کنند، تصور کرد. با این حال به نظر می‌رسد که چشم انداز خوبی برای تولید برخی روغن های میکروبی که بسادگی از طریق منابع متداول گیاهی بدست نمی‌آید، وجود دارد (Ratledge, 2005).

تولید روغن تک یاخته در دهه ۱۹۸۰ میلادی برای تولید معادل های کره کاکائو<sup>۱</sup> مورد مطالعه قرار گرفت زیرا که مقدار تولید کره کاکائو کم بود (Ratledge, 1993; 2005). مخمرهای انتخاب شده که دارای ترکیب اسیدچرب مشابه با کره کاکائو بودند (تری آسیل گلیسرول با مقادیر جزئی برابر استئاریک<sup>۲</sup>، اولئیک<sup>۳</sup> و پالمیتیک اسید<sup>۴</sup>) برای تولید معادل های کره کاکائو مورد استفاده قرار گرفتند. این مخمرها شامل رودوسپیریوم تورولوییدس<sup>۵</sup> و کریپتوکوکوس کورواتوس<sup>۶</sup> بودند. بهترین روش برای افزایش مقدار استئاریک اسید، مستلزم متوقف کردن<sup>۷</sup> جزئی فعالیت آنزیم غیراشباع کننده  $\Delta 9$  (که استئاریک را به اولئیک اسید تبدیل می کند) بود که توسط جهش زایی کریپتوکوکوس کورواتوس انجام می گرفت. روغن تک یاخته بدست آمده شامل اولئیک، استئاریک و پالمیتیک اسید به ترتیب (۳۰:۳۱:۲۴ درصد وزنی) بود که نسبتاً مشابه کره کاکائو (۳۵:۳۵:۲۸) است (جدول ۱-۱) اما این روغن بسیار ارزشمند که در مقدار زیاد تولید می شد، سرگذشتی مشابه پروتئین تک یاخته پیدا کرد. زیرا درست در همین زمان قیمت جهانی کره کاکائو از ۸۰۰۰ دلار به کمتر از ۲۵۰۰ دلار به ازای هر تن رسید (Ward and Singh, 2005).

1- Cocoa butter equivalent (CBE)

2- Stearic acid (18:0)

3- Oleic acid (18:1,  $\omega$ -9)

4- Palmitic acid (16:0)

5- *Rhodospiridium toruloides*

6- *Cryptococcus curvatus*

7- Blocking

جدول ۱-۱: ترکیب اسیدهای چرب روغن تک یاخته معادل‌های کره کاکائو (Ratledge, 2005)

	Relative % (w/w) of major fatty acids					
	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3 (n-3)	24:0
<i>Cryptococcus curvatus</i> Wt <sup>a</sup>	30	15	45	5	0.5	2
<i>C. curvatus</i> Nz <sup>b</sup>	18	24	48	3	1	2
<i>C. curvatus</i> R26-20 <sup>c</sup>	15	47	25	8	2	—
<i>C. curvatus</i> R25-75 <sup>c</sup>	33	25	33	7	1	—
<i>C. curvatus</i> F33.10 <sup>c</sup>	24	31	30	6	—	4
Yeast isolate K7-2 <sup>d</sup>	26	25	38	6	1	1
Cocoa butter	23-30	32-37	30-37	2-4	—	—

a مخمر سویه طبیعی (سویه اصلی)

b NZ سویه‌ای است که در کشور نیوزلند استفاده می‌شود.

c سویه‌های جهش‌یافته که با حذف جزئی آنزیم غیراشباع ساز  $\Delta 9$  تولید شده‌اند.

d در کشور نیوزلند جداسازی شده است.

امروزه تولید روغن‌های میکروبی که روغن تک یاخته نیز نامیده می‌شوند یک واقعیت اقتصادی است. اگرچه وجود آن‌ها به عنوان جایگزین‌های مناسب روغن‌های گیاهی و چربی حیوانی برای مدت زمان طولانی پیشنهاد شده بود ولی اولین مرحله تولید صنعتی روغن تک یاخته در سال ۱۹۸۵ میلادی در بریتانیا شروع شد که به مدت ۶ سال به فعالیت خود ادامه داد و سپس بدلیل اینکه نمی‌توانست از لحاظ قیمت با روغن‌های گیاهی رقابت کند، متوقف شد. این روغن با استفاده از قارچ موکور سیرسینللوئیدس<sup>۱</sup> تولید می‌شد و به گونه‌ای طراحی شده بود که غنی از اسید چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه گاما لینولنیک اسید<sup>۲</sup> باشد که به عنوان جایگزین روغن پامچال<sup>۳</sup> که قیمت بالایی داشت، استفاده شود. این فرآیند با استفاده از قارچی که در فرمانتورهای دارای همزن با ظرفیت ۲۲۰ متر مکعب رشد می‌کرد و مستلزم عملیات برداشت و خشک کردن توده زیستی<sup>۴</sup>، استخراج روغن تک یاخته، تصفیه و خالص‌سازی نهایی بود، انجام می‌گرفت (Ratledge, 1993; 2005).

<sup>1</sup> *Mucor circinelloides*

<sup>2</sup>  $\gamma$ -Linolenic acid (GLA; 18:3,  $\omega$ -6)

<sup>3</sup> Evening primrose oil (*Oenothera biennis*)

<sup>4</sup> Biomass

با اینکه فرآیند تولید این روغن تک یاخته برای چند سال بیشتر طول نکشید ولی باعث اثبات این مدعا شد که می توان از میکروارگانیزم به عنوان جایگزین مناسب و اقتصادی برای تولید برخی از روغن های گیاهی استفاده نمود و همچنین روغن تک یاخته میکروبی را می توان توسط روش های متداول استخراج و خالص سازی کرد و نیاز به تولید واحدهای گرانتیمنت و مخصوص استخراج نمی باشد. همچنین، روغن های میکروبی دارای اسیدهای چربی هستند که براحتی بوسیله کشاورزی قابل تولید نیستند و دارای قیمت بالایی می باشند. البته روغن های میکروبی از ارزش افزوده زیادی برخوردار بوده و از عهده هزینه تولید آن بر می آیند. اکنون مشخص شده است که این اسیدهای چرب از ارزش تغذیه ای زیادی برای نوزادان و مادران برخوردار بوده و بنابراین بازار بزرگی برای اطمینان از فروش آن ها وجود دارد (Ward and Singh, 2005).

### ۳-۱ آراشیدونیک اسید

آراشیدونیک اسید، تمام سیس های یعنی ۵، ۸، ۱۱، ۱۴ ایکوزاترانوئیک اسید، یکی از اسید های چرب اشباع نشده omega-6 است. و از نظر فیزیولوژیکی می تواند به عنوان پیشساز پروستاگلاندین ها، ترومبوکسان، پروستاگلین و لوکوترین ها عمل کند. بنابراین، کاربرد گسترده ای در پزشکی، دارویی، لوازم آرایشی، صنایع غذایی، کشاورزی و سایر زمینه ها دارد (Ji et al., 2014).

آراشیدونیک اسید دارای توابع فیزیولوژیکی متعددی است و یک ماده مغذی مهم برای نوزادان و سالمندان است. محرک های لیپیدی مشتق شده از آن می توانند نقش های مختلفی در ایجاد هوموستازیس برای انسان ها ایفا کنند (Kikukawa et al., 2018). علاوه بر این، بسیاری از سازمان های متخصص، از جمله FAO/WHO، توصیه کردند که آراشیدونیک اسید به فرمول غذای نوزاد اضافه کنید، در نتیجه آراشیدونیک اسید در حال حاضر یکی از مواد تشکیل دهنده در بسیاری از مارک های فرمول غذای نوزاد است (Zhu, et al., 2003).

گونه مورتیرا آلپینا 1S-4 به عنوان تولید کننده آراشیدونیک اسید بالا شناخته می شود و می تواند اسید های چرب غیر اشباع مختلف را از طریق مسیر بیوسنتز n-6 و همچنین ایکوزاپنتانوئیک اسید

(EPA, 20:5n-3) از طریق مسیر بیوسنتز n-3 تولید کند. در مورتیرا آلپینا 1S-4، بیشترین اسیدهای چرب غیر اشباع در قطرات چربی به عنوان تری آسید گلیسرول ذخیره می شوند، در حالی که برخی از آن ها به صورت فسفولیپیدها به عنوان اجزای سازنده غشای سلولی موجود هستند. با توجه به محتوای بالای آراشیدونیک اسید در مورتیرا آلپینا 1S-4، این قارچ یکی از مدل های قارچی برای مطالعات اساسی و کاربردی بر روی بیوسنتز اسیدهای چرب است (Kikukawa et al., 2018).

آراشیدونیک اسید دارای اثرات مثبتی در رشد نوزادان می باشد و استفاده از آن در رژیم غذایی نوزادان برای ایجاد شرایط مطلوب و بهینه به منظور توسعه سیستم غنی از غشاء مثل مغز، سیستم عصبی و عروقی نوزادان بسیار مهم می باشد. غنی سازی فرمول غذای نوزاد با آراشیدونیک اسید از پیش ساخته برای رسیدن به غلظت گلبول های قرمز خون و پلاسما معادل با نوزادان شیرده ضروری است و فرمول با ترکیبی از دکوزاهگزانوئیک اسید و آراشیدونیک اسید در پیشرفت ذهنی به اثبات رسیده است (Nisha et al., 2008). این اسید به همراه دکوزاهگزانوئیک اسید به صورت تجاری بعنوان مکمل های غذایی در بسیاری از کشورها توسعه یافته است، زیرا سبب بهبود رشد مغزی و عصبی می شود (Li et al., 2015).

عملکردهای فیزیولوژیکی متنوعی برای آراشیدونیک اسید مانند حفاظت از مخاط روده ای، درمان پسوریازیس پوستی<sup>۱</sup>، کاهش کبد چرب، کشتن سلول های غده ای و بهبود سوخت ساز چربی در کبد بیماران الکلی گزارش شده است. همچنین آراشیدونیل اتانول آمید<sup>۲</sup> که اناندامید<sup>۳</sup> نامیده می شود و آراشیدونیل گلیسرول<sup>۴</sup> به عنوان لیگاند طبیعی برای گیرنده های درد هستند و در ناحیه ای از سامانه عصبی مرکزی قرار دارند که در حافظه، تشخیص، حرکت و احساس درد نقش دارد (Higashiyama et al., 2002).

---

<sup>1-</sup> skin psoriasis

<sup>2-</sup> Arachidonyl ethanol amide

<sup>3-</sup> Anandamide

<sup>4-</sup> sn -2 arachidonyl glycerol

برای مدت زمان طولانی منابع معمول آراشیدونیک اسید عمدتاً ماهی های اقیانوس ها، اندام های حیوانی مثل غدد آدرنال خوک و زرده تخم مرغ بوده است با این حال حجم کم و خواص نامطلوب (مثل طعم ضعیف، بوی ناخوشایند و محدودیت های فصلی) استفاده از این منابع را برای تولیدات بزرگ صنعتی محدود کرده است بنابراین منابع جایگزین تولید این اسید را باید دنبال کرد (Li et al., 2015). با توجه به اینکه منبع گیاهی و حیوانی مناسب برای تولید تجاری اسیدهای چرب غیر اشباع موجود نیست (Wynn and Ratledge, 2000). لیپید های میکروبی، به عنوان روغن تک یاخته (SCO) شناخته شده، به دلیل ویژگی های منحصر به فرد خود مانند سرعت رشد بالا، محتوای چربی بالا و اجزای ساده برای تصفیه، به عنوان منابع خوب آراشیدونیک اسید هستند. قارچ جنس مورتیرا لایک قارچ روغن است که به خوبی نشان داده تولید کننده تجربی و تجاری خوبی برای تولید آراشیدونیک اسید است و تحقیقات صورت گرفته در مورد ایمنی، سلامت آن را تأیید کرده است (Li et al., 2015).

#### ۱-۴ اسیدهای چرب ضروری

اسیدهای چرب ضروری آن دسته از اسیدهای چرب می باشند که برای رشد مناسب انسان لازم می باشند ولی بدن قادر به تولید آن ها نمی باشد و بایستی که از منابع غذایی تأمین شوند. این گروه از اسیدهای چرب شامل آلفا لینولنیک اسید<sup>۱</sup> و لینولئیک اسید<sup>۲</sup> هستند که هر دو آن ها جزو اسیدهای چرب ضروری می باشند. اسیدهای چرب غیر اشباع با چند پیوند دوگانه به مقادیر کافی در بدن انسان تولید نمی شوند بنابراین باید از منابع خارجی بدست آیند. به همین دلیل آن ها را به عنوان اسیدهای چرب ضروری می نامند. البته برخی از متخصصان، اسیدهای چربی را که مستقیماً در مسیر متابولیسمی ایکوزانوئیدها<sup>۳</sup> مورد استفاده قرار می گیرند، را به عنوان اسیدهای چرب ضروری می دانند. با توجه به اینکه کمبود اسیدهای چرب ضروری می تواند اثرات منفی بر سلامت انسان داشته باشد، برخی از

<sup>1</sup>-  $\alpha$ -linolenic acid (ALA; 18:3,  $\omega$ -3)

<sup>2</sup>- Linoleic acid (LA; 18:2,  $\omega$ -6)

<sup>3</sup>- Eicosanoides

محققان توجه خود را بر یافتن منابع خارجی که می توانند این اسیدهای چرب را در مقیاس صنعتی ارزان قیمت تولید کنند، متمرکز کرده اند. اگرچه تمرکز اصلی منابع گیاهی به عنوان منابع جایگزین اسیدهای چرب ضروری برای مصرف انسان است، اما منابع قارچی نیز به عنوان منابع بالقوه محبوبیت می یابند. یکی از مزایای اصلی استفاده از قارچ ها به عنوان یک منبع صنعتی اسیدهای چرب ضروری، به جای محصولات تولیدی گیاهی احتمالاً رقابت کمتری برای زمین هایی است که برای رشد گیاهان مورد نیاز است. دومین مزیت استفاده از قارچ ها به عنوان منابع این اسیدها این است که دارای پروفایل های اسید چرب هستند که به طور طبیعی دارای اسیدهای چرب ضروری بالایی هستند. گونه های متعلق به قارچ جنس مورتیرا آلپینا در این منطقه تحقیقاتی به دلیل پتانسیل آن ها به عنوان تولید کننده های لیپید توجه زیادی را به خود جذب کرده اند. که بیشترین توجه در تحقیقات مورتیرا آلپینا مربوط به تولید اسید چرب ضروری آراشیدونیک اسید بوده است (Dyal and Narine, 2005).

## ۱-۵ تشکیل اسیدهای چرب غیر اشباع

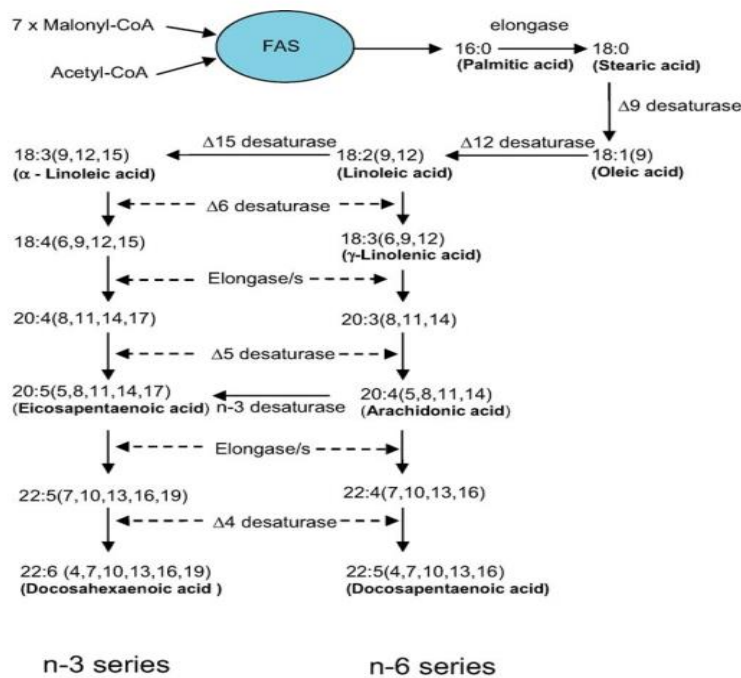
بیوسنتز اسید چرب تقریباً در همه ارگانیسم ها به تشکیل اسیدهای چرب اشباع شده پالمیتیک اسید یا استئاریک اسید منتهی می شود. این اسیدهای چرب سپس توسط یک دنباله از واکنش های متوالی آنزیم های غیراشباع ساز<sup>۱</sup> و طویل کننده<sup>۲</sup> اصلاح شده به طوری که طیف گسترده ای از اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه تولید می کنند، در (شکل ۱-۱) نشان داده شده است. اسیدهای چرب که به مقدار فراوانی یافت می شوند، البته به ترکیب ژنتیکی گونه های اختصاصی بستگی دارد. در مخمرهای روغنی، تنوع اسیدهای چرب تا حدودی محدود است: اولئیک اسید و لینولئیک اسید به همراه پالمیتیک اسید و پالمیتولئیک اسید بیشترین میزان اسیدهای چرب را تشکیل می دهند. همچنین اگر که آلفا لینولنیک اسید تولید شود، معمولاً کمتر از ۱۰٪ کل اسیدهای چرب می باشد. تولید اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه در مقادیر بیش از ۲۰٪ کل اسیدهای چرب تنها در

<sup>۱</sup> Desaturases

<sup>۲</sup> Elongases

کپک‌ها و ریزجلبک‌ها<sup>1</sup> دیده شده است. بنابراین توجه تجاری به این دسته از کپک‌ها و ریزجلبک‌ها شده که می‌توانند بیشترین میزان اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه را همراه با بیشترین میزان تری‌آسیل‌گلیسرول‌ها تولید کنند (Ratledge, 2004).

C. Ratledge / Biochimie 86 (2004) 807–815



شکل ۱-۱: مسیر متابولیسی تشکیل اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه (اسیدهای چرب از استیل کوآنزیم A و مالونیل کوآنزیم A (که خود از استیل کوآنزیم A توسط آنزیم استیل کوآنزیم A کربوکسیلاز تولید می‌شود) بوسیله آنزیم‌های کمپلکس اسید چرب سنتاز تولید می‌شوند. استئاریک اسید که یک اسید چرب اشباع می‌باشد بصورت متوالی توسط یک سری از واکنش‌ها غیراشباع و طولیل شده و تولید اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه مختلف می‌کند. اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه به دو دسته امگا-۳ و امگا-۶ بسته به اینکه موقعیت آخرین پیوند دوگانه که نزدیک به گروه متیل انتهایی می‌باشد، طبقه بندی می‌شوند. در مورتیرلا آلپینا که برای تولید آراشیدونیک اسید بکار می‌رود، آنزیم غیراشباع ساز Δ17 (n-3) وجود دارد که می‌تواند تحت برخی شرایط تولید ایکوزاپنتانویئیک اسید کند (Ratledge, 2004).

اولین پیوند دوگانه در مسیر متابولیسی هوازی که در سلول‌های یوکاریوت و برخی باکتری‌ها غالب می‌باشد، همیشه در مکان Δ9 اسیدهای چرب تشکیل می‌شود (Certik and Shimizu, 1999). بنابراین

<sup>1</sup>Microalgae

پالمیتولئیک اسید<sup>۱</sup> و اولئیک اسید<sup>۲</sup> بیشترین اسیدهای چرب تک غیراشباعی (مونوان) در میکروارگانسیم ها می‌باشند. سپس اولئیک اسید توسط آنزیم غیراشباع ساز  $\Delta 12$  به لینولئیک اسید تبدیل می‌شود که ممکن است توسط آنزیم غیراشباع ساز  $\Delta 15$  بیشتر غیراشباع شود و به آلفا لینولئیک اسید تبدیل شود. بنابراین این ۳ اسید چرب، پیش‌سازهای اصلی اسیدهای چرب امگا-۳، امگا-۶ و امگا-۹ بعدی می‌باشند (شکل ۱-۱).

مراحل بعدی تولید اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه، غیراشباع سازی پیش‌سازهای مناسب اسیدهای چرب بوسیله آنزیم غیراشباع ساز  $\Delta 6$  است که سپس طویل شدن متوالی زنجیره و واکنش های غیراشباع سازی بعدی برای تولید اسیدهای چرب غیر اشباع با چند پیوند دوگانه ۲۰ و ۲۲ کربنه می باشد (Certik and Shimizu, 1999).

اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه خانواده امگا-۹ از اولئیک اسید تولید می‌شوند که پس از فعالیت متوالی آنزیم‌های غیراشباع ساز  $\Delta 6$ ، آنزیم‌های طویل‌کننده و آنزیم غیراشباع ساز  $\Delta 5$  سرانجام به تولید مید اسید<sup>۳</sup> منتهی می‌شود. اسیدهای چرب امگا-۶ معمولاً از لینولئیک اسید پس از گذراندن مراحل غیراشباع سازی ( $\Delta 4$ ،  $\Delta 5$  و  $\Delta 9$ )، طویل شدن و تولید گاما لینولنیک اسید، آراشیدونیک اسید و آدرنیک اسید<sup>۴</sup> نهایتاً به تولید دوکوزاپنتانوئیک اسید<sup>۵</sup> ختم می‌شود. دو مسیر مجزا برای تولید اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه امگا-۳ در میکروارگانسیم ها فعال می‌باشد. در اولین مسیر که مستقل از درجه حرارت است، آلفا لینولنیک اسید از طریق مسیر امگا-۳ به ایکوزاپنتانوئیک اسید، دوکوزاپنتانوئیک اسید<sup>۶</sup> و دوکوزاهگزانوئیک اسید متابولیزه می‌شود. مسیر دوم که به درجه حرارت وابسته می‌باشد، تبدیل اسیدهای چرب امگا-۶ به امگا-۳ متناظر خودشان توسط ۲ آنزیم غیراشباع ساز

<sup>1</sup> Palmitoleic acid (16:1,  $\omega$ -9)

<sup>2</sup> Oleic acid (18:1,  $\omega$ -9)

<sup>3</sup>- Mead acid (20:3, 9,12,15)

<sup>4</sup> Adrenic acid (22:4, 7,10,13,16)

<sup>5</sup> DPA,  $\omega$ -6

<sup>6</sup> DPA,  $\omega$ -3



Δ17 و Δ15 (آنزیم‌های غیراشباع ساز امگا-۳) کاتالیز می‌شود (شکل ۱-۱) (Certik and Shimizu, 1999).

### ۱-۵-۱ نقش اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه در سلامت

دوکوزاهگزانوئیک اسید از اجزای اصلی ساختمانی جسم خاکستری مغز، شبکه چشم و جزء مهمی از بافت قلب است (Ward and Singh, 2005). مصرف دوکوزاهگزانوئیک اسید در رژیم غذایی نشان داده که برای توسعه کامل مغز و چشم در کودکان بسیار اهمیت دارد و باعث سلامت قلب و عروق می‌شود. بیشترین اسید چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه در انسان آراشیدونیک اسید می‌باشد که در اندام‌ها، خون و بافت ماهیچه‌ای وجود دارد و دارای نقش اساسی به‌عنوان لیپید ساختاری که عمدتاً در ارتباط با فسفولیپیدها است، می‌باشد. آراشیدونیک اسید اصلی‌ترین اسید چرب امگا-۶ در مغز است و همراه با دوکوزاهگزانوئیک اسید برای توسعه مغز کودکان دارای اهمیت است (Carlson et al., 1993).

تاریخچه‌ی مشاوره‌های تغذیه‌ای و سلامتی برای استفاده از اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه به سال ۱۹۷۵ میلادی برمی‌گردد. زمانیکه سازمان غذا و کشاورزی جهانی<sup>۱</sup> و سازمان بهداشت جهانی<sup>۲</sup> توصیه کردند که فرمول‌های شیر خشک بایستی مشابه شیر مادر باشد. شیر انسان غنی از دوکوزاهگزانوئیک اسید و آراشیدونیک اسید است. از سال ۱۹۹۰ میلادی به بعد تعدادی از سازمان‌های تغذیه‌ای و سلامتی اضافه کردن دوکوزاهگزانوئیک اسید و آراشیدونیک اسید را به فرمول شیر خشک کودکان نارس و کامل توصیه کردند. همچنین سازمان غذا و دارو<sup>۳</sup> ایالات متحده به تعدادی از فرآورده‌های اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه برچسب ایمنی<sup>۴</sup> داده است. از جمله آن می‌توان به افزودن روغن ماهی منهادن<sup>۵</sup> در بعضی از غذاهای بزرگسالان (۱۹۸۷ میلادی)، افزودن بعضی روغن‌های

<sup>1</sup>- Food and agriculture organization (FAO)

<sup>2</sup>- World health organization (WHO)

<sup>3</sup>- Food and drug administration (FDA)

<sup>4</sup>- Generally recommended as safe (GRAS)

<sup>5</sup>- Menhaden oil

حاوی دوکوزاهگزانوئیک اسید و آراشیدونیک اسید میکروبی به فرمول شیر خشک کودکان نارس و کامل، مصرف روغن حاوی دوکوزاهگزانوئیک اسید میکروبی در زنان حامله و شیرده و استفاده از دوکوزاهگزانوئیک اسید جلبک شیزوکتیریوم<sup>۱</sup> به عنوان خوراک طیور اشاره کرد (Ward and Singh, 2005).

اگرچه مدت زمان طولانی است که دوکوزاهگزانوئیک اسید عمده ترین اسید چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه روغن ماهیان شناخته شده است اما این اسید چرب همیشه به همراه ایکوزاپنتانوئیک اسید وجود دارد که مشخص شده است وجود آن در رژیم غذایی نوزادان اثر سوء بر جذب دوکوزاهگزانوئیک اسید دارد (Ratledge, 2004). همچنین این نگرانی و تردید از مدت ها پیش وجود داشته و دارد که استفاده از روغن ماهی به عنوان مکمل غذایی بدلیل آلودگی های محیطی ایجاد شده توسط انسان مانند دیوکسین ها<sup>۲</sup> و فلزات سنگین مانند جیوه که می توانند توسط ماهیان جذب شوند و در کبد و سایر اندام های آنان تجمع یافته، خطرناک باشند (Certik and Shimizu, 1999).

#### ۱-۶-۱ مورتیرالا آلپینا

قارچی است رشته ای oleaginous راسته زیگومیست ها و از خانواده Mortierellaceae می باشد که یک منبع غنی از اسیدهای چرب غیر اشباع است. از جمله ویژگی های این قارچ ها توانایی بالای آن ها در تولید آراشیدونیک اسید می باشد (Kavadia et al., 2001; Kawashima et al., 2000; Wynn and Ratledge, 2000).

#### ۱-۶-۱ مزایای قارچ مورتیرالا آلپینا

- توانایی چربی زایی بالا
- چربی زایی آسان و منظم

---

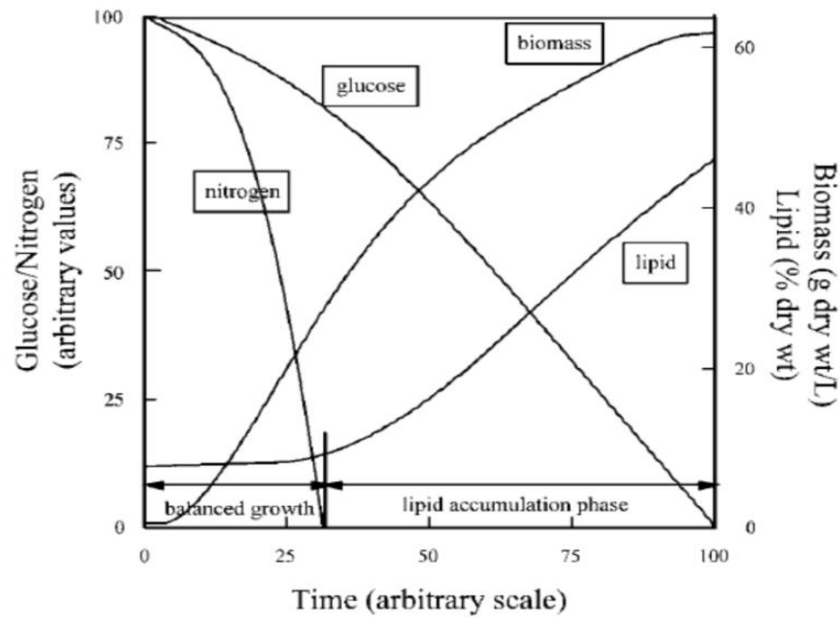
<sup>1-</sup> Schyzochytrium

<sup>2-</sup> Dioxin

- زمان تکثیر کوتاه و سریع
- جذب قند بالا
- تولید مقادیر بالایی از تری گلیسیرید (تری گلیسیرید به طور مستقیم در محصولات تجاری مصرف می شود)
- رشد در محیط های اسموفیل (دارای غلظت بالایی از قند)
- توانایی در ساخت محدوده وسیعی از اسیدهای چرب
- توانایی در ساخت مقادیر بالایی از آراشیدونیک اسید (این اسید چرب در فرمولاسیون شیر خشک نوزاد، مکمل های بدنسازی و مکمل های مورد استفاده زنان باردار و شیرده کاربرد دارد)
- در دست بودن موتان های متنوع از این قارچ
- مناسب بودن برای تولید در مقیاس صنعتی
- ایمن بودن برای مصارف انسانی و دامی (حسینی و همکاران، ۱۳۸۹).

#### ۱-۷ مکانیسم تجمع و تولید اسیدهای چرب توسط میکروارگانیسم های روغنی

تجمع روغن در میکروارگانیسم روغنی را می توان در محیط کشتی با مقدار کربن زیاد و نیتروژن کم افزایش داد، سلول ها زمانی که در معرض چنین حالتی قرار می گیرند، وارد مرحله تجمع روغن می شوند که در این مرحله کربن اضافی که هنوز در محیط کشت مورد استفاده قرار نگرفته است را به مواد ذخیره ای روغنی تبدیل می کنند. اگر سلول ها مجدداً به شرایطی که در آن منبع غذایی محدود شونده (نیتروژن) در محیط کشت موجود باشد برگردند، می توانند منابع ذخیره ای روغن را متابولیزه کرده و در تولید ساختارهای سلولی خود مورد استفاده قرار دهند. تجمع لیپید در حقیقت پاسخ میکروارگانیسم به تنش وارد شده به آن می باشد که باعث تولید روغن به عنوان یک منبع ذخیره ای درون سلولی می شود. مکانیسم تجمع روغن در گونه های روغنی هنگامی که بصورت غیر مداوم کشت داده می شوند در (شکل ۱-۲) نشان داده شده است (Huang et al., 2013).



شکل ۱-۲: نمایش شماتیکی فرآیند تجمع لیپید در میکروارگانیسم های روغنی (Cohen and Ratledge, 2015)

با توجه به شکل، تجمع لیپید در سلول های میکروبی بصورت دو مرحله ای می باشد و تنها هنگامی که نیتروژن محیط کشت به اتمام می رسد، شروع می شود (Murphy, 1991). بنابراین محیط کشت بایستی بگونه ای فرموله شده باشد که نسبت کربن به نیتروژن زیاد باشد، در این حالت نیتروژن تمام می شود در حالی که سایر مواد مغذی از جمله کربن به مقدار اضافی باقی می ماند. در عمل این نسبت حدود ۴۰ تا ۵۰ به ۱ است هر چند که نسبت بهینه را بایستی برای هر میکروارگانیسم تعیین کرد (Ratledge, 2005; Dyal and Narine, 2005).

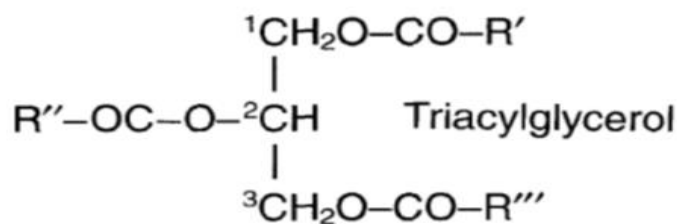
منابع کربنی مختلفی مانند هگزوزها، پنتوزها، دی ساکاریدها، گلیسرول و اتانول بطور گسترده ای برای تولید لیپید توسط قارچ های مختلفی بررسی شده است و به نظر می رسد غلظت بهینه ای از منبع کربنی برای رشد سلولی و تولید لیپید بسته به نوع قارچ وجود دارد (Stredanska and Sajbidor, 1993). توانایی تجمع لیپید در قارچ های روغنی به شدت تحت تأثیر ماهیت منبع نیتروژنی قرار می گیرد. عصاره مخمر و کنجاله سویا بطور گسترده ای در کشت های مورتیرلا به عنوان منبع نیتروژنی مورد استفاده قرار می گیرد (Kim, 1997).

برای بدست آوردن بازدهی بیشتر محصول، بهینه سازی عناصر کمیاب ترکیب محیط کشت در کنار ترکیبات اصلی کشت که در بالا ذکر شد، اهمیت زیادی دارد. فسفر، پتاسیم، گوگرد، کلسیم، سدیم، آهن و منیزیم بیشترین اجزاء غیر آلی تشکیل دهنده قارچ ها هستند. این عناصر بایستی که بطور کافی تأمین شوند و بهینه سازی غلظت آن ها مهم می باشد (Aiba et al., 1973).

## ۸-۱ لیپیدها

لیپیدها نقش مهمی در ساختار و دستگاه های ذخیره سازی ایفا می کنند و همچنین واسطه های متابولیک مهم در ارگانسیم های روغنی هستند. لیپیدها به عنوان چربی اندام ها تقریباً در تمام ارگانسیم های یوکاریوتی وجود دارند و در بعضی نقاط در طول چرخه حیاتشان ذخیره می شوند. به عنوان مثال، در مخمر و باکتری، مشاهده شده است که تجمع چربی در زمانی که ارگانسیم تحت شرایط استرس است (به عنوان مثال هنگامی که یک نسبت کربن به نیتروژن در محیط کشت وجود دارد) رخ می دهد. بخش اصلی در لیپیدها، مولکول های تری آسیل گلیسرول می باشند. مولکول تری آسیل گلیسرول شامل سه اسید چرب است که متصل به یک مولکول گلیسرول می باشند (شکل ۱-۳). و ترکیبات اسید چرب می تواند در داخل و بین ارگانسیم ها متفاوت باشد. علاوه بر این، تحقیقات نشان داده است که پروفایل اسید چرب برخی از ارگانسیم ها می تواند تحت تأثیر محیط های خارجی قرار گیرد. موقعیت اسیدهای چرب در یک مولکول تری آسیل گلیسرول تعیین کننده قابلیت زیستی آن در بدن انسان است. قبل از استفاده در داخل بدن، اسیدهای چرب باید ابتدا از اتصال مولکول گلیسرول آزاد شوند. این عمل توسط آنزیم های گوارشی مثل لیپاز پانکراس انجام می شود. لیپاز پانکراس آنزیم لیپولیتیک است که ترجیحاً اسید های چرب را در موقعیت های ۱ و ۳ مولکول های تری آسیل گلیسرول جدا می کند. به طور کلی، اسیدهای چرب اشباع ترجیحاً در موقعیت های ۱ و ۳ مولکول تری آسیل گلیسرول قرار می گیرند در حالی که موقعیت ۲ تمایل به استفاده از اسیدهای چرب اشباع نشده را دارد. بنابراین، فرض بر این است که قرار دادن ۱۰۰٪ اسیدهای چرب اشباع نشده در سطح ۲ وجود دارد، روغن باید

حاوی بیش از ۳۳٪ از اسیدهای چرب اشباع نشده باشد تا اطمینان حاصل شود که بدن از آن ها به طور مؤثری استفاده می کند. این اجازه می دهد که تمام موقعیت های ۲ توسط اسیدهای چرب اشباع نشده پر شوند و هنوز برخی از باقی مانده ها در موقعیت های ۱ و ۳ قرار می گیرند که در آن ها می تواند به طور قابل ملاحظه ای توسط لیپاز پانکراس و دیگر آنزیم ها پاره شود (Dyal and Narine, 2005).



شکل ۱-۳: ساختمان مولکول تری آسیل گلیسرول (Ratledge, 1998)

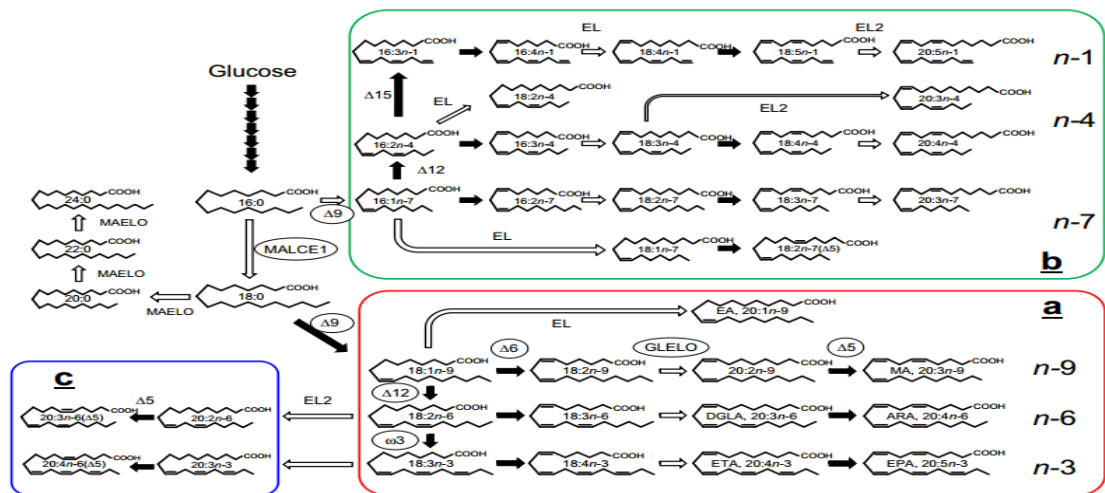
### ۹-۱ مسیر بیو سنتز اسیدهای چرب چند غیر اشباع در مورتیرلا آلپینا

از آنجایی که اولین گزارش از گونه های مورتیرلا تولید آراشیدونیک اسید در ۱۹۸۷ بود، این جنس به طور گسترده ای به عنوان منبع روغن تک یاخته امیدوار کننده برای انواع مختلف اسید های چرب غیر اشباع مورد مطالعه قرار گرفته است. به طور خاص، چندین گونه از مورتیرلا آلپینا به طور گسترده برای تولید آراشیدونیک اسید مورد مطالعه قرار گرفته اند (جدول ۱-۲). بعضی از آن ها برای تولید تجاری روغن تک یاخته غنی از آراشیدونیک استفاده می شوند. در میان آن ها، M. alpina 1S-4 دارای توانایی منحصر به فرد برای تولید طیف گسترده ای از اسیدهای چرب غیر اشباع است، همانطور که توضیح داده شده است، و مزایای متعددی دارد نه تنها به عنوان یک تولید کننده روغن های صنعتی بلکه همچنین به عنوان یک مدل برای مطالعات متابولیسم قارچ روغنی است.

جدول ۱-۲: تولید آراشیدونیک اسید توسط گونه های مختلف مورتیرالا (Kikukawa et al., 2018).

Microorganism	ARA productivity	Scale	Ref.
<i>Mortierella alpina</i> 1S-4	3.6 g/L/7 days	5 L fermentor	[29]
	3.0 g/L/10 days	2 kL fermentor	[13]
	13 g/L/10 days	10 kL fermentor	[25]
<i>M. alpina</i> ATCC32221	11 g/L/16 days	500 L fermentor	[28]
<i>M. alpina</i> ATCC32222	11 g/L/11 days	250 mL flask	[7]
<i>M. alpina</i> DSA-12	18.8 g/L/12.5 days	12 L fermentor	[26]
<i>M. alpina</i> ME-1	19.8 g/L/7 days	5 L fermentor	[27]
<i>Mortierella elongata</i> 1S-5	1.0 g/L/4 days	500 mL flask	[14]
<i>Mortierella schmuckeri</i> S12	2.3 g/L/3 days	14 L fermentor	[24]
<i>Mortierella alliacea</i> YN-15	7.1 g/L/6 days	50 L fermentor	[23]

مسیره های بیوسنتز برای اسیدهای چرب چند غیراشباع n-6، n-9 و n-3 در مورتیرالا پینا 1S-4 و جهش های آن در (شکل ۱-۴) نشان داده شده است. محصول اصلی گونه، آراشیدونیک اسید است که از طریق مسیر  $\omega 6$  تولید می شود که شامل آنزیم غیراشباع  $\Delta 12$  و  $\Delta 6$  و طویل کننده (EL2) و غیراشباع ساز  $\Delta 5$  می باشد. بسته به شرایط، مقدار کل آراشیدونیک اسید بین ۳ و ۲۰ گرم بر لیتر (۳۰ تا ۷۰ درصد کل اسیدهای چرب سلولی) با ۷۰ تا ۹۰ درصد تولید آراشیدونیک اسید است، که به عنوان تری آسید گلیسرول حضور دارد. این سویه ایکوزاپنتانوئیک اسید (تقریباً ۱۰٪ کل اسیدهای چرب) را در زیر دمای رشد ۲۰ درجه سانتیگراد تولید می کند و با افزودن روغن های حاوی آلفالینولنیک اسید (18:3n-3) مانند روغن بذر کتان را نشان می دهد (Kikukawa et al., 2018).



شکل ۱-۴: مسیر کلی تولید زیستی اسیدهای چرب در مورتیرا آلپینا 1S-4 و جهش های آن (Kikukawa et al., 2018)

## ۱-۱۰ بیوشیمی تجمع روغن

دانستن این مطلب که چگونه میکروارگانیسم ها اسیدهای چرب مورد نیاز خود را تولید کرده و قادر به تجمع مقادیر زیادی روغن می باشند از اهمیت حیاتی برای توسعه فرآیندهای تولید روغن تک یاخته برخوردار می باشد. در بعضی از میکروارگانیسم ها میزان روغن بیشتر از ۷۰٪ توده زیستی آن ها را تشکیل می دهد. به علاوه روغن تجمع یافته بصورت تری آسیل گلیسرول می باشد که دقیقاً به همان صورتی است که در روغن های گیاهی وجود دارد. با توجه به این اطلاعات، شناسایی ژن هایی که آنزیم های کلیدی در تولید اسید چرب و تجمع آن هستند دارای اهمیت زیادی می باشد، مشخص می شود. بنابراین می توان میکروارگانیسم ها را به گونه ای دستکاری کرد که منجر به افزایش لیپید آن ها شود یا اینکه سطح اسید های چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه عمده را در لیپید آن ها افزایش داد. با توجه به اینکه ارزانترین روش برای تهیه روغن های غیراشباع استفاده از گیاهان می باشد. و همچنین هیچ گیاهی اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه بلندتر از ۱۸ کربن را تولید نمی کند، بنابراین برای تولید این گونه اسیدهای چرب، دستورزی ژنتیکی گیاهان ضروری به نظر می رسد. اما با توجه به اعتراض عمومی نسبت به گیاهان مهندسی ژنتیکی شده، علاوه بر مدت زمان زیادی که برای تولید آن



ها لازم است، مدت زمان بیشتری برای اجازه و مقبولیت فروش آن ها وجود خواهد داشت (Ratledge, 2004).

بررسی ها نشان داد که مسیر تولید زیستی اسید چرب در اغلب میکروارگانیسم های روغنی مشابه گونه های غیر روغنی مانند ساکارومایسس سرویسیه<sup>۱</sup> می باشد، با این حال یک تفاوت اساسی بین میکروارگانیسم های روغنی و غیر روغنی وجود دارد. به منظور دستیابی به تجمع روغن در یک میکروارگانیسم، نیاز به رشد آن در محیط کشتی است که مقادیر زیادی از منابع کربنی و مقدار محدودی از منابع نیتروژنی را دارا باشد (اگر چه مواد مغذی دیگر را می توان محدود کرد، ولی نیتروژن معمول تر است). بنابراین وقتی که ارگانیسم رشد می کند به سرعت منبع نیتروژنی را تخلیه می کند، اما همچنان منبع کربن (معمولاً گلوکز یا یک منبع کربوهیدرات جایگزین دیگر) را جذب می کند. سپس آن را به طور مستقیم به سنتز لیپید هدایت می کند و به همین ترتیب تولید تری آسیل گلیسرول در داخل سلول به صورت قطرات روغنی مجزا از یکدیگر می شود. تجمع روغن ممکن است بیش از ۷۰٪ توده زیستی را به خود اختصاص دهد که البته در تمام میکروارگانیسم های روغنی اینگونه نیست. با توجه به تعریف، تجمع روغن در میکروارگانیسم های غیر روغنی صورت نمی گیرد. هنگامی که در یک محیط کشت محدود کننده نیتروژن قرار می گیرند، تکثیر سلولی آن ها متوقف می شود و اگر که به جذب منابع کربنی ادامه دهند آن ها را به سایر پلی ساکاریدهای گوناگون مانند گلیکوژن و گلوکان های متفاوت، مانان ها و غیره تبدیل می کنند. تجمع روغن فراتر از یک سطح بسیار کوچک (معمولاً کمتر از ۱۰٪ توده زیستی) رخ نمی دهد. بنابراین می توان نتیجه گرفت که توانایی میکروارگانیسم ها برای تجمع روغن بایستی خارج از محدوده بیوسنتز اسید چرب باشد که به عنوان ماشین تولید زیستی لیپید در سایر میکروارگانیسم ها رایج است.

---

1- *Saccharomyces cerevisiae*

2- Glycogen

3- Glucan

4- Mannan

روغنی بودن میکروارگانیسم ها را می توان به دو مورد زیر مربوط دانست (Ratledge, 2004):

۱. توانایی تولید یک محصول مستمر استیل کوآنزیم<sup>۱</sup> A به طور مستقیم در سیتوزول<sup>۲</sup> سلول به عنوان

یک پیش ساز ضروری برای اسید چرب سنتتاز<sup>۳</sup>

۲. توانایی تولید یک منبع کافی از نیکوتین آمید دی نوکلئوتید فسفات احیاء شده<sup>۴</sup> به عنوان یک احیاء

کننده ضروری در بیوسنتز اسید های چرب

شکل گیری استیل کوآنزیم A در میکروارگانیسم های روغنی به دلیل وجود آنزیم آدنوزین تری فسفات-

سیترات لیاز<sup>۵</sup> می باشد که در اکثر گونه های غیر روغنی این پدیده رخ نمی دهد (واکنش شماره ۱).

برای فعالیت مؤثر این واکنش سوپسترای آن یعنی اسید سیتریک<sup>۶</sup> باید به آسانی قابل دسترس باشد و

علاوه بر آن در سیتوزول سلولی که در آن تولید اسید چرب رخ می دهد، در دسترس باشد.

(واکنش شماره ۱) Citrate + CoA + ATP → acetyl-CoA + oxaloacetate + ADP + P<sub>i</sub>

البته سیتریک اسید به عنوان جزئی از چرخه تری کربوکسیلیک اسید<sup>۷</sup> داخل میتوکندری<sup>۸</sup> سلول سنتز

شده است (همانطور که در بالا اشاره شد تمامی میکروارگانیسم های روغنی یوکاریوت هستند و بنابراین

دارای میتوکندری می باشند). ویژگی که در میکروارگانیسم های روغنی منحصر بفرد است و به آن ها

اجازه تجمع سیتریک اسید می دهد، فعالیت آنزیم ایزوسیترات دهیدروژناز<sup>۹</sup> به عنوان یک جزء چرخه

تری کربوکسیلیک اسید وابسته به حضور آدنوزین منو فسفات است که این وابستگی در میکروارگانیسم

غیر روغنی دیده نشده است.

---

<sup>1</sup>- Acetyl-CoA

<sup>2</sup>- Cytosol

<sup>3</sup>- Fatty acid synthase (FAS)

<sup>4</sup>- Nicotine amine dinucleotide phosphate (NADPH)

<sup>5</sup>- ATP-citrate lyase (ACL)

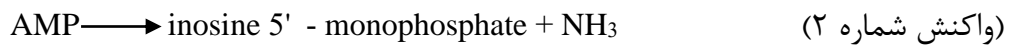
<sup>6</sup>- Citric acid

<sup>7</sup>- Tricarboxylic acid (TCA)

<sup>8</sup>- Mitochondria

<sup>9</sup>- Isocitrate dehydrogenase (IDH)

میزان آدنوزین مونو فسفات نیز توسط آدنوزین مونو فسفات- دامیناز<sup>۱</sup> تنظیم می شود (واکنش شماره ۲).



فعالیت این آنزیم در ابتدای شروع محدودیت منبع نیتروژنی در محیط کشت میکروارگانیسم های روغنی تشدید می شود که وسیله ای برای به دام انداختن یون های آمونیوم اضافی از مواد درون سلولی است. محدودیت منبع نیتروژنی در محیط کشت میکروارگانیسم های روغنی موجب القاء یک سری واکنش هایی می شود که منجر به تشکیل استیل کوآنزیم A می شود (Ratledge, 2004).

• در شروع کاهش منبع نیتروژنی، سلول های روغنی افزایش فعالیت آدنوزین مونو فسفات- دامیناز از خود نشان می دهند که تا پنج برابر بیشتر از زمانی است که سلول ها در شرایط محدودیت نیتروژنی نمی باشند.

• افزایش فعالیت آدنوزین مونو فسفات- دامیناز باعث کاهش محتوای سلولی آدنوزین مونو فسفات، که شامل محتوای آن در میتوکندری می شود.

• محتوای کاهش یافته آدنوزین مونو فسفات در میتوکندری، فعالیت ایزوسیترات دهیدروژناز را در سلول های روغنی متوقف می کند، این آنزیم به شدت به فعالیت آدنوزین مونو فسفات وابسته است.

• در نتیجه، ایزوسیترات متابولیزه نمی شود. بنابراین، تجمع می یابد و سپس به راحتی با اسید سیتریک (توسط آنزیم آکونیتاز<sup>۲</sup>) به تعادل می رسد.

• بنابراین سیترات در میتوکندری تجمع می یابد.

• بوسیله سامانه کارآمدی که در غشای میتوکندری وجود دارد، سیترات<sup>۳</sup> به خارج از میتوکندری فرستاده می شود (در تبادل با مالات<sup>۴</sup>).

---

<sup>1</sup>-AMP-deaminase

<sup>2</sup>- Aconitase

<sup>3</sup>- Citrate

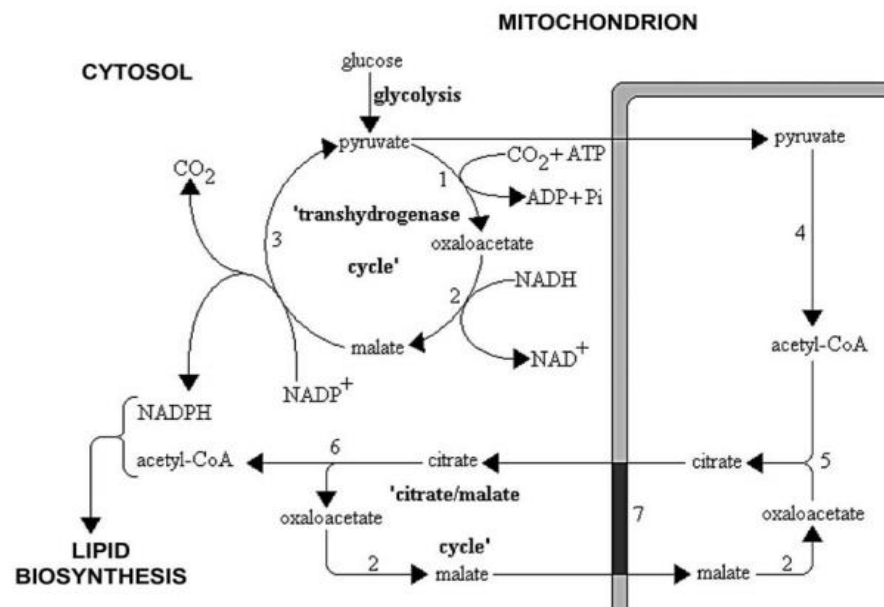
<sup>4</sup>- Malate

• سیترات وارد سیتوزول می شود و توسط آنزیم آدنوزین تری فسفات-سیترات لیاز به اگزالواستات و استیل کوآنزیم A تجزیه می شود.

• استیل کوآنزیم A برای بیوسنتز اسید های چرب استفاده می شود.

• اگزالواستات از طریق مالات دهیدروژناز<sup>۱</sup> به مالات تبدیل می شود که به عنوان یون مخالف<sup>۲</sup> در سامانه انتقال سیترات استفاده می شود.

این واکنش های متوالی به صورت نمودار در (شکل ۱-۵) نشان داده شده است.



شکل ۱-۵: نمودار چگونگی فعالیت چرخه سیترات/مالات و چرخه ترانس هیدروژناز سیتوزولی برای تأمین مقادیر کافی پیش‌سازهای استیل کوآنزیم A و نیکوتین آمین آدنین فسفات احیاء شده برای تولید زیستی لیپید در میکروارگانیسم های روغنی. آنزیم‌ها عبارتند از: ۱. پیروات دکربوکسیلاز ۲. مالات دهیدروژناز ۳. آنزیم مالیک ۴. پیروات دهیدروژناز ۵. سیترات سینتاز (Ratledge, 2004).

اگرچه این روند سوخت و ساز گلوکز به استیل کوآنزیم A را می توان برای جریان سوبسترای کربنی برای استفاده در تولید زیستی اسید چرب تحت شرایط محدودیت نیتروژنی در نظر گرفت ولی این تمام ماجرا نیست. هر چند فعالیت آنزیم آدنوزین تری فسفات-سیترات لیاز در بعضی از میکروارگانیسم ها

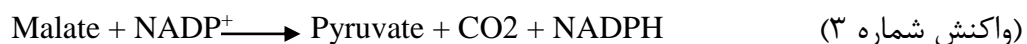
<sup>3</sup>- Malate dehydrogenase

<sup>4</sup> Counter ion

مشاهده شده است ولی این سلول ها قابلیت تجمع لیپید را ندارند. البته عکس این حالت مشاهده نشده است یعنی اینکه هیچ میکروارگانیسم روغنی تاکنون گزارش نشده است که فاقد فعالیت آنزیم آدنوزین تری فسفات-سیترات لیاز باشد. بنابراین بایستی آنزیم های دیگری نیز برای اطمینان از تجمع لیپید وجود داشته باشند.

شایان ذکر است که اسیدهای چرب موادی بسیار احیاء شده بوده و برای تولید آن ها وجود ذخیره کافی از یک ماده احیاء کننده مانند نیکوتین آمید دی نوکلئوتید فسفات احیاء شده بسیار ضروری است. برای تولید یک مولکول اسید چرب نیاز به ۱۶ مول نیکوتین آمید دی نوکلئوتید فسفات احیاء شده می باشد که دو مول نیکوتین آمید دی نوکلئوتید فسفات احیاء شده برای احیاء گروه ۳-کتو-آسیل چرب<sup>۱</sup> نیاز است که در طی هر واکنش تراکمی استیل کوآنزیم A و مالونیل کوآنزیم A<sup>۲</sup> ایجاد می شود و به عنوان بخش مهمی از کمپلکس اسید چرب سنتاز می باشد که به زنجیره آسیل چرب اشباع کمپلکس شده که بعداً چرخه های طولانی شدن زنجیر را طی می نماید.

در حال حاضر منبع اصلی تأمین کننده نیکوتین آمید دی نوکلئوتید فسفات احیاء شده برای تولید زیستی اسید چرب، آنزیم مالیک در نظر گرفته می شود (واکنش شماره ۳).



فعالیت آنزیم مالیک در بسیاری از میکروارگانیسم های روغنی مشاهده شده است و به نظر می رسد که به همراه آنزیم آدنوزین تری فسفات-سیترات لیاز و کمپلکس اسید چرب سنتاز تشکیل یک مجموعه سوخت و سازی یکپارچه را برای اطمینان از هدایت یافتن و تبدیل شدن استیل کوآنزیم A به اسیدهای چرب می دهد که این اسیدهای چرب در نهایت توسط گلیسرول بصورت تری آسیل گلیسرول استریفیه

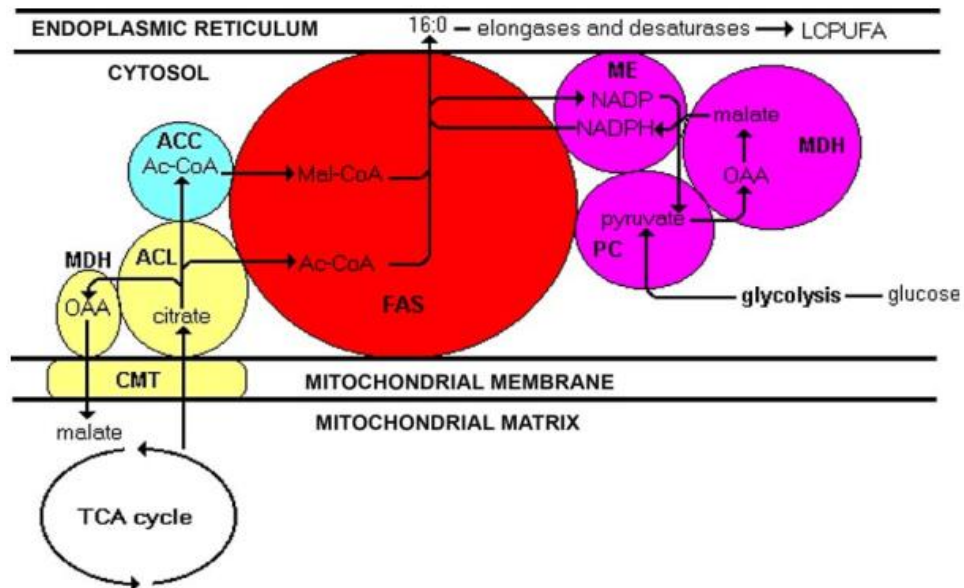
---

<sup>1</sup>- 3-Keto-fatty acyl group

<sup>2</sup>- Malonyl-CoA

شده و بوسیله دستگاه رتیکولوم اندوپلازمی به شکل قطره های اسید چرب تشکیل می شوند (شکل ۱-۶).

C. Ratledge / Biochimie 86 (2004) 807-815



شکل ۱-۶: نمودار روند پیشنهادی برای تولید زیستی لیپیدهای میکروبی [جریان کربن از میتوکندری از طریق جریان تبدیلی سیترات، تشکیل استیل کوآنزیم A در سیتوزول و تولید اسیدهای چرب و نهایتاً تولید اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه بلند زنجیر (LCPUFAs) که در غشاهای شبکه اندوپلازمی صورت می گیرد توسط خطوط ممتد نشان داده شده است. این سامانه پیرووات (بدست آمده از فرآیند گلیکولیز) را به عنوان تامین کننده استیل کوآنزیم A درون میتوکندری و برای تولید سیتریک اسید همانطور که در شکل قبلی توضیح داده شده است، مورد استفاده قرار می دهد. OAA: اگرالواستات، AC-CoA: استیل کوآنزیم A، Mal-CoA: مالونیل کوآنزیم A، FAS: اسید چرب سنتاز، ACL: آدونوزین تری فسفات سیترات لیاز، ACC: استیل کوآنزیم A کربوکسیلاز، CMT: سیترات/مالات ترانسلوکاز، ME: آنزیم مالیک، PC: پیرووات کربوکسیلاز و MDH: مالات دهیدروژناز] (Ratledge, 2004).

با این وجود فعالیت آنزیم مالیک در تمام میکروارگانیسم های روغنی دیده نشده و ممکن است در برخی از مخمرهای روغنی مانند گونه های لیپومایسس<sup>۱</sup> و برخی گونه های کاندیدا<sup>۲</sup> وجود نداشته باشد. در

<sup>۱</sup> Lipomyces

<sup>۲</sup> Candida

این حالت این احتمال وجود دارد که یک آنزیم جایگزین تولیدکننده نیکوتین آمید دی نوکلئوتید فسفات احیاء شده مانند ایزوسیترات دهیدروژناز وابسته به نیکوتین آمید دی نوکلئوتید فسفات احیاء شده سیتوزولی، هر چند که احتمال وجود آنزیم های دیگری نیز می باشد، که به تولید زیستی اسید چرب در همان مسیری که مانند آنزیم مالیک بصورت عملکردی با متابولیت اسید چرب مرتبط است، اختصاص داشته باشد (Ratledge, 2004).

### ۱-۱۱ عوامل موثر بر تولید آراشیدونیک اسید

بهبود فرآیندهای زیستی و کاهش هزینه های آن برای گسترش بازار فروش روغن تک یاخته ضروری می باشد. عوامل متعددی بازده، بهره وری و میزان کل اسیدهای چرب با چند پیوند دوگانه را تحت تأثیر قرار می دهد (Rosa et al., 2010). تجمع لیپید در درجه اول به فیزیولوژی میکروارگانیسم، محدودیت ماده مغذی و عوامل محیطی مثل دما و pH بستگی دارد. همچنین تحت تأثیر تولید متابولیت های ثانویه مثل سیترات و اتانول نیز قرار می گیرد (Beopoulos et al., 2009). در طول بیست سال گذشته، سن گونه، غلظت اکسیژن محلول، دما، pH، ترکیبات محیط کشت از قبیل منبع کربنی، نیتروژنی و افزودن مواد معدنی بر تولید آراشیدونیک اسید بررسی شده و به عنوان عوامل کلیدی شناخته می شوند (Jin et al., 2008).

### ۱-۱۱-۱ منبع کربن

تا کنون منابع کربنی متفاوتی از قبیل گلوکز، مالتوز، لاکتوز، نشاسته محلول و سدیم استات برای رشد این میکروارگانیسم ها استفاده شده است اما گلوکز از نظر چربی کل به ازای وزن خشک توده سلولی منبع بهتری نسبت به سایر منابع ارزیابی شده است (Dyal and Narvine, 2005).

با توجه به اینکه در تولید روغن های میکروبی، منبع کربن مسئول ۶۰ تا ۷۵ درصد کل هزینه ها است. بنابراین تولید روغن تک یاخته از لحاظ اقتصادی دارای اهمیت است، باقیمانده های کشاورزی می توانند به عنوان یک منبع جایگزین کربن باشند. در این راستا، انتخاب محصولات و باقی مانده هایی که از

لحاظ اقتصادی برای تولید مناسب هستند، اهمیت حیاتی دارند چهار نوع اصلی از منابع کم هزینه که تا کنون برای تولید روغن های میکروبی استفاده کرده اند: (۱) منابع غنی از مونوساکاریدها و دی ساکاریدها مانند ملاس، آب انگور و قندهای صنعتی؛ (۲) مواد نشاسته دار، که شامل یک بخش مهم از بقایای کشاورزی و صنعتی، از قبیل غلات و حبوبات؛ (۳) گلیسرول، به عنوان یک ماده امیدوارکننده کم هزینه و تجدید پذیر برای فرآیندهای میکروبیولوژی مورد استفاده قرار گرفته و یک منبع کربنی است که توسط میکروارگانیسم ها به آسانی مصرف شده؛ (۴) اسید لیگنوسلولز، که سخت تر به مصرف می رسند مانند: نیشکر، برنج، کاه، گندم، پوست برنج می توانند به عنوان منابع تجدیدپذیر برای رشد میکروارگانیسم ها در تولید محصول مورد استفاده قرار گیرند. در دسترس بودن بقایای کشاورزی و صنعتی دارای اهمیت بسیار زیادی است، بنابراین دانشمندان باید بر روی فرایندها و تکنولوژی های پیش تصحیح هیدرولیز تمرکز کنند تا بتوانند بیشتر از این زباله ها به عنوان منبع کربن برای تخمیر میکروارگانیسم های روغنی استفاده کنند (Finco et al., 2016). همچنین پساب تولیدی در فرآیند چغندر قند، پساب کنجاله سویا، روغن خام سویا و پولک های کانولا در تخمیر غوطه وری به کار گرفته شده اند (Dong and Walker, 2008a; Dong and Walker, 2008b).

### ۱-۱۱-۲ منابع نیتروژنی

مطالعات نشان داده است که منبع نیتروژنی آلی برای رشد قارچ و تولید اسیدهای چرب غیر اشباع بهتر از منبع نیتروژنی غیرآلی است. قارچ مورتیرا آلپینا منابع نیتروژن غیرآلی را به سختی مصرف می کند و برای تولید مقادیر قابل توجه ای از توده سلولی نیازمند اسیدهای آمینه یا پروتئین است. گزارش شده است هنگامی که نترات سدیم با شربت خیسانده ذرت جایگزین می شود بازده آراشیدونیک اسید افزایش می یابد (Dong and Walker, 2008a).

بهترین منبع نیتروژنی برای تولید بیشترین لیپید و آراشیدونیک اسید عصاره مخمر بوده و این را به ویتامین ها و عوامل رشدی که در آن وجود دارد نسبت می دهند. عصاره مخمر شامل پودری از سلول



کامل مخمر بدون دیواره سلولی و نیز حاوی گلوتامیک اسید می باشد، بنابراین می توان بسیاری از مواد مغذی مورد نیاز میکروارگانیسم ها را تأمین کرد. نشان داده شده است که در مخلوطی از منابع نیتروژن آلی و غیرآلی، عصاره مخمر بالاترین مقدار توده زیستی را تولید می کند (Dyal and Narine, 2005). اثر نسبت کربن به نیتروژن مصرفی روی تولید آراشیدونیک اسید و ریخت شناسی میسلایوم های مورتیرا آلپینا بررسی شده است. نتایج نشان داده است که بازده سلولی در نسبت کربن به نیتروژن پایین تر از ۷ افزایش یافته؛ رشد سلولی در نسبت ۷-۱۵ به تولید زیستی لیپید سوق پیدا می کند و هنگامی که این نسبت بین ۱۵-۳۲ است تولید لیپید بسیار زیاد خواهد بود. اگرچه در نسبت های بالاتر از ۱۵ رشد سلولی کاهش می یابد ولی تجمع لیپید ادامه خواهد داشت. در حضور نیتروژن مقدار توده سلولی به مقدار نیتروژن وابسته است در حالی که مقدار آراشیدونیک اسید رابطه عکس با مقدار نیتروژن دارد. بهترین نسبت کربن به نیتروژن برای تولید آراشیدونیک اسید بین ۱۵-۲۰ به دست آمد (Koike et al., 2001).

### ۱-۱۱-۳ غلظت اکسیژن محلول

به طور کلی یک تخمیر هوازی برای به دست آوردن بازدهی بالا نیازمند انتقال جرم کارآمد و تأمین اکسیژن کافی می باشد. تولید آراشیدونیک اسید نیازمند اکسیژن کافی است زیرا آراشیدونیک اسید در طی غیراشباع سازی آنزیمی تولید می شود که از نظر نیاز به اکسیژن قابل مقایسه با اکسیژناسیون<sup>۱</sup> می باشد. بنابراین تأمین اکسیژن کافی توسط همزدن، هوادهی و کنترل ریخت شناسی (که تحت تأثیر میزان اکسیژن محلول قرار می گیرد) عوامل کلیدی برای به دست آوردن مقادیر بالاتر آراشیدونیک اسید در سلول ها می باشد (Higashiyama et al., 2002).

---

<sup>1</sup>- Oxygenation

#### ۱-۱۱-۴ pH

pH یکی از مهم ترین پارامترهای مؤثر بر رشد سلول و فرآیند تولید محصولات متابولیسمی است. به طور کلی pH می تواند بر روی فعالیت آنزیم ها، مواد مغذی در دسترس به عنوان یک نتیجه تغییر شار غشاء سلولی تأثیر گذار باشد. مطالعات نشان داده که pH اولیه عامل مهمی برای عملکرد آراشیدونیک اسید است. علاوه بر این آراشیدونیک اسید یک متابولیت درون سلولی است که به طور همزمان برای رسیدن به توده زیستی زیاد به دست می آید و برای تولید نهایی آراشیدونیک اسید بسیار مهم است که غلظت این اسید نسبتاً بالا باشد بنابراین حفظ pH ثابت در طول فرآیند تخمیر ممکن است برای تولید حداکثری آراشیدونیک اسید مطلوب نباشد. بالاترین میزان تولید آراشیدونیک اسید در ۵/۵ pH در ابتدای تخمیر (تا حدود ۶۰ ساعت) و در ۶/۵ pH پس از ۶۰ ساعت بدست آمد. از این رو استراتژی کنترل دو مرحله ای pH برای به دست آوردن نرخ بالای رشد سلولی و نرخ تولید آراشیدونیک اسید می تواند کارآمد باشد (Li et al , 2015).

#### ۱-۱۱-۵ دما

دمای مناسب برای تولید آراشیدونیک اسید توسط مورتیرا آلپینا ۱۶-۲۸ درجه سانتیگراد است و تولید آن در ۲۴-۲۸ درجه سانتیگراد در بیشترین مقدار می باشد، روغن تولیدی در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد عاری از ایکوزاپنتانوئیک اسید بوده و برای مصرف در شیر خشک نوزادان بسیار مطلوب خواهد بود (kyle, 1996; Shimizu et al., 1988; Dyal and Narine, 2005). اسیدهای چرب غیراشباع n-3 در طی غیراشباع سازی n-3 که دماهای زیر ۲۰ فعال می شود در این قارچ تجمع می یابند در حالیکه مقداری از آراشیدونیک اسید که در مسیر متابولیسمی n-6 تولید می شود به ایکوزاپنتانوئیک اسید تبدیل می شود بنابراین دماهای پایین سبب کاهش تولید آراشیدونیک اسید در این قارچ می شود (Sakuradani et al., 2004).

## ۱-۱۱-۶ مدت زمان تخمیر

افزایش مدت زمان تخمیر باعث افزایش توده سلولی و میزان تولید آراشیدونیک اسید توسط مورتیرلا

آلپینا

می شود. گونه های مورتیرلا آلپینا بهترین میزان تولید آراشیدونیک اسید را در مدت ۱۰ تا ۱۵ روز نشان داده اند. آنچه در این میان اهمیت دارد این است که افزایش بیش از اندازه زمان تخمیر باعث کاهش صرفه اقتصادی محصول تولیدی می شود. به همین علت، بایستی مدت زمان تخمیر به گونه ای انتخاب شود که بیشترین راندمان در کمترین زمان ممکن به دست آید (قبادی، ۱۳۸۸).

## ۱-۱۲ درونپوشانی ترکیبات زیست فعال

درونپوشانی<sup>۱</sup> فرآیند به دام انداختن عوامل فعال در درون مواد حامل بوده و ابزاری مفید جهت بهبود تحویل مواد زیست فعال (مانند آنتی اکسیدان ها، موادمعدنی، ویتامین ها، فیتواستروئول ها، لوتئین، اسیدهای چرب، لیکوپن) و سلول های زنده (مثل پروبیوتیک ها) درون غذاها می باشد. درون پوشانی را می توان به عنوان تکنولوژی قراردعی مواد مایع، جامد و گازی شکل درون کپسول های کوچک تعریف کرد که در ادامه، این کپسول ها محتویات درون خود را در مقادیر کنترل شده در طی بازه های زمانی طولانی مدت، و تحت شرایط ویژه، در مناطق هدف رها می کنند (Desai et al., 2005). این تکنیک، مواد واکنش پذیر را از سایر اجزای سیستم غذایی جدا و انتشار آن ها را کنترل می کند (Weiss et al., 2008). معمولاً ذرات درون پوشانی شده قطری از چند نانومتر تا چند صد میکرومتر دارند. تولید میکرو/نانوانکپسولاسیون با هدف ایجاد مرز به منظور ممانعت از واکنش های شیمیایی نامطلوب و رهاسازی کنترل شده ترکیبات زیست فعال خصوصاً ویتامین ها می باشد (Katouzian and Jafari, 2016). مواد مورد استفاده در طراحی پوسته حمایت کننده از کپسول ها باید خوراکی و زیست تخریب پذیر بوده و قادر به ایجاد مانع میان فاز درونی و محیط اطراف خود باشند. از میان تمامی مواد، گسترده

---

<sup>1</sup>- Encapsulating

ترین دامنه مصرف در درون پوشانی با کاربرد غذایی را پلی ساکاریدها، پروتئین‌ها و لیپیدها دارند که با گذشت زمان باعث حفظ خصوصیات طبیعی و ذاتی محصول می شوند (Nedovic et al., 2011).

### ۱-۱۲-۱ دلایل استفاده از کپسوله سازی در صنایع غذایی

- حفاظت از عامل فعال درگیر شده در برابر ضررهای تغذیه ای و تعامل با عوامل محیطی مضر (مانند گرما، نور، هوا و رطوبت)
- کاهش تبخیر و سرعت انتقال عامل هسته به خارج
- خواص فیزیکی مواد اصلی را می توان تغییر داد مانند تبدیل مایع به یک سیستم جامد خشک برای دستیابی آسان
- انتشار مواد هسته ای در طول زمان به صورت کنترل شده
- پوشاندن خواص ارگانولپتیک ناخوشایند مانند بوی و طعم برخی ترکیبات
- پیشگیری از ناسازگاری بین اجزای مخلوط کپسوله شده
- عامل کپسوله شده را می توان زمانی که مقدار بسیار کمی از آن مورد نیاز است رقیق کرد (Eghbala and Choudhary, 2018).

### ۱-۱۲-۲ مواد کپسول سازی و هدف

کپسوله سازی شامل استفاده از دو ماده است:

الف) کپسول ب) مواد دیوار

لازم به ذکر است که تمام مواد درگیر در فرآیند انکپسولاسیون باید به طور عمومی به عنوان ایمن شناخته شوند. انتخاب مواد پوشش بستگی به خواص فیزیکی و عملکرد مواد محصور شده و در حال حاضر، پلیمرهای طبیعی، پلی ساکاریدها و پروتئین‌ها و ترکیبات آن‌ها به دلیل بهترین خواص آن‌ها، از جمله قابلیت بازسازی، هزینه، تجزیه زیستی و پایداری، ترجیح داده می شود. آب می تواند در چندین فرآیند مورد استفاده قرار گیرد، اما با توجه به ماهیت لیپوفیلی مواد غذایی و مزایای تکنولوژیکی برای

به دست آوردن اندازه های کوچک، باید حلال های سبز از جمله مایعات فوق بحرانی استفاده شود. تثبیت کننده هایی نظیر سورفکتانت ها (به عنوان مثال: صمغ ها، پلی سوربات ها، مشتقات سلولز، پروتئین ها، لسیتین، پلی وینیل الکل و غیره) استفاده شده است (Zambrano-Zaragoza and Quintanar-Guerrero, 2018).

### ۱-۱۳ نانوانکپسولاسیون در صنایع غذایی

به تولید و به کارگیری مواد، دستگاه ها و سیستم ها در مقیاس نانو (کوچکتر از ۱۰۰ نانومتر) تکنولوژی نانو می گویند. نانو تکنولوژی در سال های اخیر در صنایع غذایی کاربردهای بسیاری پیدا کرده است (Fathi and Mohebbi, 2010). از جمله کاربردهای این تکنولوژی شامل: نانوانکپسولاسیون و تحویل و حمل ترکیبات زیست فعال در صنایع غذایی، داروسازی و لوازم آرایشی- بهداشتی می باشد (Sagalowicz and Leser., 2010, Farokhzad and Langer., 2009, Müller et al., 2007, Liu et al., 2007). نانوحامل ها باعث افزایش سطح، حلالیت و دسترسی زیستی ترکیبات زیست فعال شده و در مقایسه با حامل های در سطح میکرو، رهایش و رسیدن به نقطه هدف اجزاء غذایی انکپسوله شده را بهتر کنترل می کنند (Weiss et al., 2008). سیستم های تحویلی سیستم هایی هستند که مواد زیست فعال، جهت کنترل رهایش ماده زیست فعال، داخل آن به دام می افتد. نانوحامل ها از ترکیبات زیست فعال در برابر عوامل نامساعد محیطی مثل اکسیداسیون، احیای آنزیمی و pH حافظت می کنند (Ghosh et al., 2009). تکنولوژی کپسوله کردن ذرات زیست فعال در اندازه هایی با مقیاس نانو را نانو انکپسولاسیون می گویند (Lopez-Rubio et al., 2006).

علاوه بر این، درعین حالی که نانوانکپسولاسیون قابلیت پخشپذیری و توزیع ترکیبات نامحلول در آب را افزایش می دهد، نباید بر روی خواص حسی، رنگ و طعم محصول تأثیرگذار باشد. حفظ ترکیب درونپوشانی شده طی فرآیند انتقال به ماده غذایی و همچنین در طی مدت نگهداری، باید در بالاترین حد باشد، در مقابل میزان رهایش آن در مکان جذب باید بهینه باشد (De Vos et al., 2010).

مهمترین عامل جهت به دست آوردن ذراتی با اندازه و رنگ مطلوب برای هر نوع کاربردی انتخاب مناسب فرآیند، امولسیفایرها و دیگر ترکیبات مورد استفاده است. البته کنترل دقیق و درست فرآیند نیز در حین تولید فرمولاسیون ها ضروری است (Tamjidi et al., 2013).

نانوفرمولاسیون ها براساس جنس دیواره به سه گروه تقسیم می شوند: نانوحامل های بر پایه لیپید و سورفکتانت، نانوحامل های بر پایه پلی ساکارید و نانوحامل های بر پایه پروتئین (Oehlke et al., 2014). ترکیبات آن ها به دلیل بهترین خواص آن ها، از جمله قابلیت بازسازی، هزینه، تجزیه زیستی و پایداری ترجیح داده می شود (Zambrano-Zaragoza and Quintanar-Guerrero, 2018).

به دلیل مزایای سلامتی بخش غذاهای عملگرایی چربی دوست شامل ارزش تغذیه ای بالا، خواص آنتی اکسیدانی، ضد عفونت، التیام جراحات و ضد سرطان بودن مورد توجه زیادی قرار گرفته اند. همچنین از جمله محدودیت های کاربرد ترکیبات چربی دوست در سیستم غذا شامل حلالیت بسیار پایین آن ها در آب، دسترسی زیستی دهانی کم، حساسیت بالا در برابر حرارت و اکسیداسیون، تخریب در طول فرآیند و نگهداری و داشتن اجزاء غیر قابل امتزاج با دیگر ترکیبات هیدروفیل مهم می باشد. بنابراین برخی تکنولوژی ها جهت بهبود حلالیت آبی، حفاظت در برابر تخریب و اکسیداسیون و افزایش دسترسی زیستی دهانی توسعه پیدا کرده است (Shin et al., 2015).

#### ۱-۱۴ امولسیون

امولسیون شامل دو مایع غیر قابل اختلاط می باشد، که یکی از مایع ها به صورت قطرات ریز کروی در داخل دیگری پراکنده می شود (McClements and Decker, 2000). در صنایع غذایی، دو مایع غیر قابل اختلاط معمولاً روغن و آب می باشند، اما همیشه این نکته الزامی نیست و به عنوان مثال، یک محصول می تواند امولسیون w/w باشد. در صنایع غذایی امولسیون مفهوم گسترده ای را شامل می شود و می تواند سیستم هایی که ممکن است گاز، جامد و یا کریستال های مایع باشند مانند بستنی، خمیر کیک، مایونز و غیره را شامل شود (Rousseau, 2000). خصوصیات حسی و فیزیکی شیمیایی محصولات

غذایی بر پایه ی امولسیون به شدت تحت تأثیر مشخصات قطرات تشکیل دهنده ی آن شامل غلظت، اندازه، بار و واکنش های آن ها می باشد. قطر قطرات تشکیل دهنده ی محصولات غذایی می تواند در محدوده ۱۰۰-۰/۱ میکرومتر باشد. امولسیون ها بر اساس توزیع نسبی فازهای مختلف به دو دسته ی اصلی تقسیم می شوند: ۱- امولسیون روغن در آب، که قطرات روغن در فاز آبی پراکنده شده ۲- امولسیون آب در روغن، که قطرات آب در فاز روغنی پراکنده شده است. ماده ای که قطرات را تشکیل می دهد معمولاً فاز پراکنده یا فاز درونی نامیده می شود و به مایع اطراف آن فاز پیوسته یا فاز خارجی گفته می شود. هموژنیزاسیون فرآیندی است که آب و روغن توده را به امولسیون تبدیل می کند و اندازه ذرات را در امولسیون کاهش می دهد. در صنایع غذایی هموژنیزاسیون با هم زدن مکانیکی شدید در مخلوطی از مایع با دستگاهی به نام هموژنایزر که انواع مختلفی دارد، مثل میکسر با برش بالا، هموژنایزر با فشار بالا، آسیاب کلوئیدی، و هموژنایزر فراصوت انجام می گیرد. برخلاف میکروامولسیون ها، ماکروامولسیون ها ذاتاً از نظر ترمودینامیکی ناپایدار هستند به دلیل اینکه، تماس بین مولکول های آب و روغن نامطلوب می باشد و باعث تفکیک دو جزء از هم می شود (McClements, 2007).

عوامل موثر بر پایداری امولسیون شامل اندازه ذرات، ویژگی های غشای آن ها، گرانیوی فاز پیوسته، اختلاف چگالی دو فاز، pH فاز آبی، نوع و شدت تنش های محیطی نظیر فرآیندهای حرارتی، انجماد و رفع انجماد می باشند (Kokal, 2005).

در صنایع غذایی تولید امولسیون که از نظر ترمودینامیکی به مدت طولانی پایدار باشد نیازمند همکاری ترکیباتی به نام امولسیفایر می باشد. امولسیفایرها عوامل فعال سطحی هستند که در سطح قطرات امولسیون جذب شده و پوشش محافظی را برای جلوگیری از تراکم قطرات با هم شکل می دهند. امولسیفایرها می توانند مولکول های کوچک سورفکتانت مثل فسفولیپیدها، پلی سوربات ها و پروتئین ها مثل پروتئین شیر و یا عوامل غلیظ کننده مثل صمغ و ژلاتین باشند (Rousseau, 2000). به علاوه، امولسیفایر ها باعث کاهش کشش بین سطحی، کاهش مقدار انرژی مکانیکی مورد نیاز جهت تشکیل امولسیون، شکستن قطرات امولسیون در طی هموژنیزاسیون را آسان کرده و باعث کمک به تشکیل

امولسیون با قطرات کوچکتر می شوند. این پایدار کننده ها باعث جلوگیری از مکانیسم های فلوکه شدن، انعقاد، ادغام و وارونگی فاز می شوند (Kokal, 2005).

## ۱-۱۵ نانوامولسیون ها

### ۱-۱۵-۱ تعریف و ساختار شیمیایی نانوامولسیون ها

نانوامولسیون نوعی امولسیون است که در آن اندازه ذرات فاز پراکنده بین ۱۰ تا ۱۰۰۰ نانومتر تعریف شده اند، البته برخی این محدوده را بین ۱۰ تا ۵۰۰ نانومتر می دانند (Delmas et al., 2011). نانوامولسیون را می توان یک سیستم شامل فاز آبی، فاز روغنی و سورفکتانت هایی دانست که از نظر ترمودینامیکی پایدار می باشند. به کمک سورفکتانت ها یک فاز در فاز دیگر پخش می شود. به فاز پراکنده فاز داخلی و به فاز در برگیرنده فاز بیرونی می گویند. نانو امولسیون ها می توانند محلول آب در روغن یا روغن در آب باشند. این به خصوصیات روغن و سورفکتانت استفاده شده و فشردگی هندسی سر قطبی و دم هیدروکربنی مولکول های سورفکتانت بستگی دارد (Shah et al., 2010). امولسیون ها کاربرد گسترده ای در صنعت مواد غذایی، لوازم آرایشی و بهداشتی و داروسازی دارند. به همین دلیل پایداری امولسیون ها در درجه بالایی از اهمیت قرار دارد، این در حالی است که امولسیون ها از لحاظ ترمودینامیکی ناپایدارند و با گذشت زمان با کاهش کشش بین سطحی فازها به صورت خود به خودی ناپایدار می شوند. نانوامولسیون ها کشش سطحی بیشتری نسبت به ماکروامولسیون ها دارند و این تمایل در آن ها بیشتر می باشد. از طرفی نانوامولسیون ها به واسطه اندازه ذرات کوچکشان تمایل کمتری به جدایی فاز دارند و از لحاظ سینتیکی پایدارتر می باشند. اصولاً نانوامولسیون ها، به واسطه اندازه ویژه، ظاهری شفاف یا نیمه شفاف دارند و به توزیع اندازه قطرات از پایداری سینتیکی بالا، گرانشی کم، پایداری بالا در برابر پدیده هایی ترسیب، خامه ای شدن، به هم پیوستن و لخته شدن برخوردار هستند و به همین دلایل امروزه برای کاربردهای صنعتی فراوانی مورد توجه قرار گرفته اند (Gutiérrez et al., 2007).



## ۱-۱۶ اکسیداسیون

اکسیداسیون یک واکنش شیمیایی می باشد که الکترون ها را از یک ماده به عامل اکسید کننده انتقال می دهد. واکنش های اکسیداسیون می تواند باعث تولید رادیکال آزاد شود که آغازگر واکنش های زنجیره ای است و باعث تخریب سلول می شود (Hamid et al., 2010). امولسیون های غذایی از ابتدای تولید تا پایان مصرف تحت تیمارهای فیزیوشیمیایی قرار می گیرند. تحت این شرایط و با حضور اکسیژن، ترکیبات فعال شیمیایی ممکن است اکسید شوند. از بین آن ها اسید های چرب چند غیر اشباعی (PUFA) به طور ویژه ای مستعد اکسیداسیون می باشند. اکسیداسیون لیپید تأثیر قابل توجهی بر کیفیت تکنیکی، حسی و تغذیه ای مواد غذایی دارد. همچنین باعث به هدر رفتن ترکیبات مغذی و منجر به شکل گیری رادیکال های آزاد و ترکیبات سمی می شود (Berton-Carabin et al., 2014). رادیکال های آزاد تأثیر شدیدی در بیماری های مزمن مانند: تصلب شرایین، اختلالات مغزی و سرطان دارند (صمدلوئی و همکاران، ۱۳۸۶).

از جمله مکانیسم های اصلی که باعث اکسیداسیون لیپید در امولسیون ها می شود برهم کنش بین هیدروپراکسیدهای لیپیدی که در سطح قطره تجمع یافته اند و فلزات واسطه (استقرار یافته در فاز آبی) که تجزیه هیدروپراکسیدهای لیپیدی به رادیکال های آزاد با واکنش پذیری بالا (از جمله آن ها رادیکال های آلکوکسیل و پراکسیل) را تسریع می بخشد، می باشند. یک روش مؤثر برای افزایش پایداری اکسیداسیون لیپیدی بازدارندگی توانایی آهن برای واکنش با هیدروپراکسید می باشد. عواملی که می تواند توانایی آهن را تحت تأثیر قرار دهد، تجمع فیزیکی پراکسیدان ها در فاز پیوسته (برای حفاظت از پراکسیدان ها برای ایجاد تماس نزدیک با سطح قطره) و خصوصیات لایه ای قطره (بار، ضخامت و غیره) می باشند (Kargar et al., 2012).

اکسیداسیون روغن های خوراکی تحت تأثیر انرژی مصرف شده مانند نور یا حرارت، ترکیب اسیدهای چرب، نوع اکسیژن و ترکیبات فرعی مانند فلزات، پیگمنت ها، فسفولیپیدها، اسیدهای چرب آزاد و مونو و دی آسید گلیسرول و آنتی اکسیدان ها قرار می گیرد (Choe and min, 2006).

اکسیداسیون یک واکنش تک مرحله ای نیست بلکه ترکیبی از واکنش های مختلف است. اکسیداسیون شامل سه مرحله آغازین، توسعه و پایانی می باشد. در مرحله اول مولکول اکسیژن با اسید های چرب غیر اشباع وارد واکنش می شود و هیدروپراکسیدها و رادیکال های آزاد را تولید می کند. در مرحله دوم، اکسیداسیون توسط محصولات شیمیایی تولید شده در مرحله اول ادامه می یابد و واکنش های زنجیره ای رادیکال آزاد صورت می گیرد. در مرحله ی پایانی، رادیکال های آزاد به هم ملحق شده و از فرم رادیکالی خارج می شوند (Inanc and Maskan, 2012). زمانی که روغن اکسید می شود مجموعه ای از محصولات تجزیه شده را در مراحل مختلف تولید می کند. ابتدا محصولات اولیه اکسیداسیون شامل پراکسیدها، دی ان ها و اسیدهای چرب آزاد و سپس محصولات ثانویه اکسیداسیون شامل کربونیل ها، آلدئیدها و تری ان ها و در نهایت سومین محصولات تولید می شوند.

#### ۱-۱۷ نانوزل<sup>۱</sup>

نانوزل ها، نانوذرات ژل در اندازه کمتر از صد نانومتر با ساختار شبکه ای سه بعدی از زنجیره های پلیمری و محلول در آب می باشند. امروزه نانوزل ها را از پلیمرهای طبیعی یا سنتزی تهیه می کنند. پلیمرهای طبیعی در سال های اخیر در تهیه نانوزل ها برای کاربردهای مهندسی بافت و داروسازی مورد توجه زیادی قرار گرفته اند (Liu et al., 2008; Nanjawade et al., 2007). عواملی مانند عدم سمیت، دسترسی آسان، قیمت مناسب و همچنین داشتن گروه های عاملی فراوان در ساختار اصلی مانند گروه های هیدروکسی، آمین و اسید کربوکسیلیک آن ها را برای تشکیل اتصالات عرضی و نیز اتصال به لیگاندها یا ماده فعال مناسب کرده است. از جمله پلیمرهای زیستی پرکاربرد در این زمینه کیتوزان، دکسترین و سلولز می باشند. دلایل استفاده از نانوزل ها به عنوان حامل: کوچک بودن، خلل و فرج زیاد شبکه های ماکرومولکولی، گنجایش و استحکام بالا و قدرت واکنش پذیری به فاکتورهای محیطی می

---

<sup>1</sup>- Nanogel

باشد. نانوذله ها به دو نوع مختلف نانوهیدروژل<sup>۱</sup> و نانوارگانوژل<sup>۲</sup> تقسیم می شوند. نوع اول ترکیب هیدروژل ها در مقیاس نانو که توانایی جذب مقدار قابل توجهی آب را دارند (با بالاترین درجه تورم در آب) در حالی که نوع دوم، نانوذله های آب گریز با گرایش برای مواد روغنی دارند. در واقع نانوارگانوژل ها، میسل هایی شبیه به نانوذرات هستند که در تماس با آب تجمع پیدا کرده که نواحی آب گریز خود را در مرکز جا می دهند. (Chacko et al., 2012; Raemdonck et al., 2009). در دهه گذشته، محدوده وسیعی از نانوذرات پلی ساکاریدی برای درونپوشانی ترکیبات زیستی مورد پژوهش قرار گرفته است. در میان ساختار های پلی ساکاریدی، کیتوزانی که توسط استیلن زدایی کیتین تولید می شود و ترکیب اصلی سخت پوستان مانند خرچنگ و میگو می باشد به دلیل زیست سازگاری بالا مورد استفاده قرار گرفته است. تحقیقات نشان داده است که نانوذله ها بر پایه کیتوزان می توانند در مهندسی بافت، داروسازی و به عنوان حامل های ماکرومولکولی استفاده شوند (Khalili et al., 2015).

## ۱۸-۱ کیتوزان

کیتوزان یک محصول طبیعی است و دومین و فراوان ترین پلی ساکارید طبیعی پس از سلولز روی زمین است. کیتوزان از کیتین با حذف یک قسمت استات استخراج شده و ساختار کیتوزان از پیوندهای خطی (1-4) B گلیکوزیدی ساخته شده است که شبیه به سلولز است. کیتوزان یک پلیمر پلی کاتیونی است که دارای یک گروه آمین و دو گروه هیدروکسیل بر روی هر یک از گلوکوزیدهای باقی مانده است (Yang et al., 2017). مثبت بودن بار کیتوزان در شرایطی که تعداد زیادی از پلی ساکاریدها یا دارای بار منفی و یا خنثی در یک محیط اسیدی می باشند، بسیار قابل اهمیت است. این ویژگی به کیتوزان این اجازه را می دهد که با دیگر پلی مرهای طبیعی و یا سنتزی که دارای بار منفی می باشند ترکیب های الکترواستاتیک یا ساختارهای چندگانه تشکیل دهد (Cheung et al., 2015).

---

<sup>1</sup>- Nano-hydrogel

<sup>2</sup>- Nano-organogel

## ۱-۱۸-۱ توانایی کیتوزان به عنوان امولسیفایر

کیتوزان در پایداری امولسیون ها استفاده می شود زیرا ویسکوزیته فاز پیوسته را افزایش می دهد. به عبارت دیگر باعث کاهش پراکندگی قطرات و سرعت خامه ای شدن می شود (Agulló et al., 2003). همچنین ساختار پلی الکترولیت کیتوزان باعث ایجاد برهمکنش الکترواستاتیکی آن با پلیمرهای فعال سطحی با بار مخالف یا سورفکتانت هایی که قبلاً در سطح قطرات روغن جذب شده می شود و باعث ایجاد یک لایه بین سطحی محافظتی توسط پایداری الکترواستاتیک و استریک می شود (Klinkesorn, 2013).

در مقایسه با امولسیون هایی که شامل قطرات آنیونی هستند یا آن هایی که با لایه های نازک تر پوشیده شده اند، امولسیون هایی که شامل قطرات کیتوزان کاتیونی با لایه های بین سطحی ضخیم می باشند پایداری بهتری در برابر اکسیداسیون لیپیدها ایجاد می کنند (Mei et al., 1998; Silvestre et al., 2000). تحقیقات اندکی ویژگی های امولسیون کنندگی کیتوزان را به تنهایی و بدون اصلاح هیدوفوبیکی یا بدون ترکیب آن با دیگر عوامل فعال سطحی توضیح می دهند. در بعضی تحقیقات، کیتوزان برای فعالیت سطحی ضعیف در سطح مشترک آب و روغن پیشنهاد می شود و افزایش غلظت کیتوزان باعث کاهش اندکی در تنش سطحی در مقایسه با مولکول های آمفی فیلیک سنتی می شود (Li and Xia, 2011; Klinkesorn, 2013). فعالیت سطحی کم کیتوزان با توجه به ساختار مولکولی آن قابل فهم می باشد. کیتوزان دارای گروه های آبدوست (گروه های آمین) زیادی است، اما محدود بودن گروه های آبگریز (گروه های آمین استیل) و همچنین توزیع تصادفی گروه های غیر قطبی تراکم آن ها را در سطح مشترک آب و روغن به علت بازدارندگی استریک بیشتر کاهش می دهد (Rodriguez et al., 2002).

## ۱-۱۹ کاپریک اسید

کاپریک اسید با نام شیمیایی یا آیوپاک آن دکانوئیک اسید (Decanoic acid)، اسید چربی با فرمول شیمیایی  $C_{10}H_{20}O_2$  و وزن مولکولی ۱۷۲/۲۶۸ گرم بر مول است. شکل ظاهری این ترکیب، یک جامد

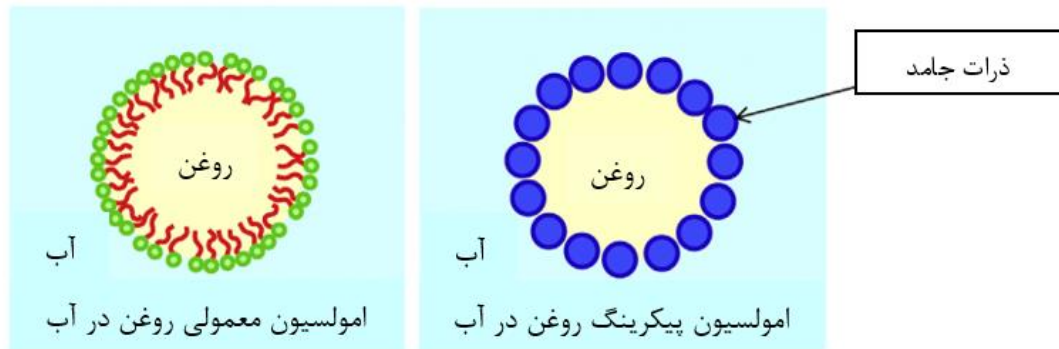
بلور با کریستال های سفید، دارای بوی بسیار بد و ناخوشایند است. نقطه ذوب آن  $31/5$  درجه سلسیوس می باشد. همچنین دارای نقطه جوش  $270$  درجه سلسیوس و تراکم نسبی  $0/8885$  و شاخص انکساری  $1/4169$  است. عملاً در آب نامحلول، ولی در اکثر حلال های آلی مثل الکل، اتر، بنزن، کلروفرم، دی سولفید کربن و اسید نیتریک رقیق محلول می باشد و غیر سمی است (شهبازی، ۱۳۹۶).

#### ۱-۲۰ استئاریک اسید

استئاریک اسید یک اسید چرب با زنجیره طولانی است. این ترکیب مومی شکل و جامد بوده با فرمول شیمیایی  $C_{18}H_{36}O_2$  و وزن مولکولی  $284/48$  گرم بر مول می باشد. نقطه ذوب آن  $69$  درجه سانتی گراد و نقطه جوش آن  $361$  درجه سانتی گراد است. در صنایع غذایی، دارویی، نوشیدنی ها، کشاورزی و محصولات آرایشی و بهداشتی استفاده می شود. همچنین چون خنثی، زیست سازگار، ارزان و غیرسمی است، در سیستم های رهایش دارو کاربرد دارد (Schmidt et al., 2006).

#### ۱-۲۱ امولسیون پیکرینگ

امولسیون های ساخته شده بدون استفاده از امولسیفایر در صنایع مختلف مورد توجه زیادی قرار گرفته اند. یک راه حل مناسب برای مقابله با معایب امولسیفایر مانند تحریک پذیری، سمیت، به دام انداختن هوا، کف کنندگی و برهم کنش با ماده زنده جایگزین کردن ذرات جامد و تولید امولسیون هایی که پیکرینگ نامیده می شوند می باشد (Frelichowska et al., 2010). امولسیون معمولی و امولسیون پیکرینگ در (شکل ۱-۷) نشان داده شده است.



شکل ۱-۷: تصویر شماتیکی یک امولسیون معمولی روغن در آب (بر پایه سورفکتانت) و یک امولسیون پیکرینگ روغن در آب (Chevalier and Bolzinger, 2013).

تحقیقات نشان داده است، امولسیون های پیکرینگی که در آن قطرات با نانوذرات پوشانده شده اند، دارای بیشترین پایداری هستند. همچنین، قطرات امولسیون باید بزرگتر از ۱۰۰ نانومتر باشند، به دلیل اینکه، قطرات کوچک نمی توانند به طور کامل پوشانده شوند. فضای خالی سطح مشترک روغن-آب منجر به انعقاد یا فلوکه شدن قطره می شود به دلیل اینکه، سیستم در تلاش است تا مساحت بین سطحی کل را در سطح مشترک روغن-آب به حداقل برساند. همچنین، امولسیون پیکرینگ با قطرات کوچک در طول زمان از طریق خامه ای شدن تمایل به ناپایدار شدن دارد (Kuipers, 2009).

امولسیون های پیکرینگ می توانند بوسیله ی ذرات فعال بین سطحی مختلف مثل ذرات غیرآلی، ذرات کامپوزیتی آلی-غیرآلی، میکروژل ها و ذرات زیستی پایدار شوند (Yang et al., 2017). تعیین خصوصیات امولسیون های پیکرینگ معمولاً بوسیله ی اندازه ذره، نسبت روغن به آب، pH، رطوبت پذیری ذره، غلظت نمک و نوع حلال انجام می گیرد (Diaz-Salmeron et al., 2016).

پایداری بالای امولسیون پیکرینگ به اتصال ذرات پایدار کننده در سطح مشترک قطرات نسبت داده شده است که انرژی آزاد در سطح مشترک را تغییر داده و از طریق ایجاد یک مانع فیزیکی از انعقاد قطرات جلوگیری می کند (Sabouni and Gomaa, 2015).

همچنین، شکل گیری امولسیون پیکرینگ به عنوان یک استراتژی امیدوار کننده برای افزایش پایداری اکسیداتیو لیپید از طریق شکل گیری لایه ی بین سطحی بر پایه ذره در نظر گرفته شده است.

## ۱-۲۲ تعاملات کلوئیدی

### ۱-۲۲-۱ نیروی استریک

قطرات در امولسیون های غذایی با یک لایه نازکی از مولکول های امولسیفایر پوشیده شده اند که این مولکول های امولسیفایر می توانند سورفکتانت ها، فسفولیپیدها و یا پلی ساکاریدها باشند. وقتی دو قطره به سمت همدیگر حرکت کنند و خیلی به هم نزدیک شوند لایه ی امولسیفایری هم پوشانی می کند و بین آن ها برهم کنش به وجود می آید. در این حالت نیروی استریک اهمیت پیدا می کند. نیروی استریک نتیجه ۲ برهمکنش در لایه سطحی است: ۱. مخلوط شدن ۲. فشردگی در فواصل خیلی کوتاه و کم هنگامی که دو قطره در هم به شدت مخلوط شوند برهم کنش دافعه استریک غالب و مانع از ادغام شدن ذرات در هم می شود. نکته مهم این است که قدرت این نیروی استریک کاملاً تحت تأثیر لایه امولسیفایری است همچنین ضخامت لایه امولسیفایری و فشردگی لایه، ویژگی های رئولوژیکی لایه، برهم کنش های مولکولی درونی لایه امولسیفایری و در نهایت نوع امولسیفایر می تواند بر قدرت برهم کنش استریک مؤثر باشد. از این رو دانستن دقیق این نیرو می تواند در پایداری قطره از طریق انتخاب امولسیفایر مناسب مؤثر باشد (McClements, 2016).

### ۱-۲۲-۲ نیروی هیدراتاسیون

این نیرو ناشی از مولکول های آبی است که در اطراف مولکول های قطبی یا یون ها ایجاد می شود. تفاوت این نیرو با نیروی هیدروفوبیکی در این است که در هیدروفوبیسیتته نیرو تحت اثر جمع شدن مولکول های آب اطراف ذرات غیر قطبی می باشد ولی در هیدراتاسیون مولکول های آب اطراف ذرات قطبی جمع می شوند. اکثر امولسیفایرهای غذایی دارای گروه های یونی و قطبی هستند مانند  $\text{OH}^-$ ،  $\text{NH}_3^+$ ،  $\text{CO}_2^-$  و بعضی هم به یون ها متصل می شوند مثل  $\text{Na}^+$  و  $\text{OH}^-$ . با نزدیک شدن دو قطره به هم گروه های قطبی و مولکول های آب قطبیه شده در نزدیکی آن به هم وصل شده و باعث ایجاد دافعه می شوند که میزان آن وابسته به میزان و تعداد یون های سطحی امولسیفایر می باشد و هرچه یون ها

بیشتر هیدراته شوند نیروی دافعه و شعاع تأثیرگذاری دافعه افزایش می یابد. میزان دافعه هیدراتاسیون به مقدار بار یون و میزان حضور یون بستگی دارد و حضور الکترولیت ها از طریق خنثی کردن یون ها باعث کاهش هیدراتاسیون می شوند. از طرف دیگر یون های روی سطح ذره با افزایش هیدراته شدنشان دافعه شدیدتری بین قطرات ایجاد می کنند به علت اینکه نیروی زیادی لازم است تا یون ها را دهیدراته کند و مولکول های آب را از سطح قطرات دور کند. بنابراین یون های قوی تحرک مولکول های آب را گرفته و آن ها را در اطراف خود ثابت نگه می دارند و وقتی که یون ها جذب امولسیفایر می شوند میزان آب سطحی را به شدت افزایش می دهند (آبی که توانایی حرکت ندارد). پس این دافعه می تواند با تغییر ماهیت و غلظت یون در فاز پیوسته تغییر کند (McClements, 2016).

### ۱-۲۳ رئولوژی

رئولوژی دانش بررسی، تغییر شکل و جریان پذیری مواد تحت تأثیر نیرو می باشد. رئولوژی برای تمام مواد از گازها تا مایعات کاربردی است. علم رئولوژی حدود یک قرن سابقه دارد که برای اولین بار به علت نیاز به توصیف خواص سیالات مطرح شد. اگر ویسکوزیته مقاومت در برابر جریان و الاستیسیته ساختار و پایداری ابعاد ماده را معرفی کند، می توان گفت که رئولوژی در واقع رفتار ویسکوز و الاستیک سیستمها را به صورت مجزا و در ارتباط با یکدیگر بررسی می کند.

### ۱-۲۳-۱ طبقه بندی مواد از لحاظ رئولوژی

الف) مواد ویسکوز (ب) مواد الاستیک (ج) مواد ویسکوالاستیک

الف) مواد ویسکوز: موادی هستند که با اعمال تنش، تغییر شکل داده و با برداشتن تنش به حالت اولیه باز نمی گردند و در حقیقت کل انرژی وارده را تلف می کنند و به دو دسته نیوتنی و غیر نیوتنی تقسیم بندی می شوند.

سیال ویسکوز نیوتنی: سیالاتی که از قانون نیوتنی ویسکوزیته پیروی می کنند. در این نوع سیال ها ویسکوزیته مستقل از سرعت برشی است. گازها، روغن ها و آب جزو سیالات نیوتنی هستند.



سیال ویسکوز غیر نیوتنی: در این نوع سیالات، ویسکوزیته به صورت تابعی از تغییر شکل برشی است و تنش با سرعت برشی به صورت خطی تغییر نمی کند.

ب) مواد الاستیک: مواد صد درصد الاستیک موادی هستند که وقتی تحت تنش قرار می گیرند، تغییر شکل داده و با تنش، به حالت اولیه باز می گردند به عبارت ساده تر کل انرژی وارده را در خود ذخیره می کنند.

ج) مواد ویسکوالاستیک: موادی هستند که رفتاری بین مواد صد درصد ویسکوز و صد درصد الاستیک دارند این مواد در حالت مایع کل انرژی را تلف نمی کنند و در حالت جامد نیز کل انرژی را ذخیره می کنند (Schuster, 1996).

#### ۱-۲۴ زاویه تماس

زاویه تماس ( $\theta$ ) یک پارامتر برای ارزیابی میزان آبدوستی و همچنین سرعت جذب آب می باشد. زاویه تماس ( $\theta < 90^\circ$ ) نشان دهنده حلالیت بالای جامد است و زاویه تماس ( $\theta > 90^\circ$ ) نشان دهنده حلالیت پایین جامد است. رفتار انحلال پذیری یک فرآیند پویائی است که مایع به تدریج در پودر نفوذ می کند، که با مشاهده تغییرات زاویه تماس در طول زمان مشاهده می شود (Ji et al., 2016).



## فصل دوم

### مروری بر مطالعات پیشین

## ۱-۲ کارهای انجام گرفته بر روی مورتیرا آلپینا

Kikukawa و همکاران در سال ۲۰۱۸ به بررسی تولید عملی آراشیدونیک اسید از طریق گونه جهش یافته مورتیرا آلپینا 1S-4 و تجزیه و تحلیل عملکرد ژن های کدگذاری شده آنزیم های درگیر در بیوسنتز اسیدهای چرب غیر اشباع مفید پرداختند. میزان تولید آراشیدونیک اسید در مورتیرا آلپینا 1S-4، ۰/۷۶ g/l بود که ۳۴٪ کل اسیدهای چرب را تشکیل می دهد (Kikukawa et al., 2018).

Sakamoto و همکاران در سال ۲۰۱۷ به بررسی تولید مولکولی مورتیرا آلپینا برای تولید بالای لینولئیک اسید و اولئیک اسید پرداختند. میزان تولید لینولئیک اسید نسبت به کل اسید چرب به ۵ برابر افزایش یافت و میزان اولئیک اسید به کل اسید چرب به ۶۸٪ رسید. و تولید لینولئیک اسید و اولئیک اسید در روز پنجم به ترتیب به ۱/۴۴ و ۲/۷۶ گرم در لیتر رسید (Sakamoto et al., 2017).

Li و همکاران در سال ۲۰۱۵ با بررسی یک روش کنترل دو مرحله ای pH بر اساس تجزیه و تحلیل سینتیکی برای فرآوری آراشیدونیک اسید مؤثر در گونه مورتیرا آلپینا، برای ۴۸ ساعت اول برای کوتاه شدن دوره سازگاری pH در ۵/۵ تنظیم شد و بعد از ۴۸ ساعت به منظور افزایش رشد سلول های تولید کننده آراشیدونیک اسید به ۶/۵ تغییر یافت. با استفاده از این استراتژی تولید آراشیدونیک اسید با کنترل pH حداکثر ۸/۱۲ گرم در لیتر به دست آمد. و همچنین اثرات کشت های خوراکی بر عملکرد آراشیدونیک اسید بیشتر مورد بررسی قرار گرفت. حداکثر کارایی آراشیدونیک اسید در غلظت ۵۰ گرم بر لیتر گلوکز با سرعت ثابت حدود ۱/۴۰ گرم بر لیتر بدست آمد. این استراتژی ساده و مقرون به صرفه بود، و از این روش ممکن است برای تولید صنعتی آراشیدونیک اسید در نظر گرفته شود تا تولید و بهره وری بالایی داشته باشد.

در مطالعه ای Li و همکاران در سال ۲۰۱۵ به بررسی افزایش تولید آراشیدونیک اسید از گونه های جهش یافته مورتیرا آلپینا پرداختند. سویه جهش یافته D20 با تولید آراشیدونیک اسید از ۵/۰۹ گرم در لیتر، افزایش ۴۰/۶۱ درصدی نسبت به سویه اصلی (۳/۶۲ گرم در لیتر)، نشان داد. محتوای نسبی

آراشیدونیک اسید از ۳۸/۹۹ درصد به ۴۵/۶۴ درصد از کل اسیدهای چرب افزایش یافته است. پس از بهینه سازی شرایط تخمیر، حداکثر عملکرد آراشیدونیک اسید (۶/۳۸ گرم در لیتر) برای سویه D20 در شیکر های همزن دار به دست آمد. این مطالعه نشان می دهد که گونه های جهش یافته همراه با یک استراتژی هدفمند یک روش قابل قبول برای افزایش عملکرد گونه های تولید کننده آراشیدونیک اسید فراهم می کند (Li et al., 2015).

Ji و همکاران در سال ۲۰۱۴ به مطالعه تولید روغن غنی از آراشیدونیک اسید توسط قارچ مورتیرا آلپینا پرداختند. روند تخمیر مورد نیاز به دلیل نرخ رشد پایین این قارچ طولانی بود. این امر موجب کاهش بهره وری روغن غنی از آراشیدونیک اسید شد و مانع تولید انبوه آن در صنعت گشت. در مطالعه صورت گرفته، به منظور کاهش مدت زمان تخمیر، از یک استراتژی مختلف تغذیه ای استفاده شد. نتایج نشان داد که در تخمیر با کشت غیر مداوم، دوره تخمیر از ۷ روز به ۵ روز کاهش یافت و با استفاده از روش تخمیر مداوم میزان تولید آراشیدونیک اسید از ۰/۹ گرم بر لیتر به ۱/۳ گرم بر لیتر افزایش یافت. با استفاده از این روش کشت، دوره تخمیر از ۴۰ روز به ۲۸ روز کاهش یافت، این استراتژی برای فرآیند تولید تجاری روغن غنی از آراشیدونیک اسید مناسب و مقرون به صرفه است (Ji et al., 2014).

در تحقیقی که توسط Nisha و همکاران در سال ۲۰۰۸ انجام گرفت مشخص شد که بهترین pH برای تولید آراشیدونیک اسید ۶/۵ می باشد و مورتیرا آلپینا در pH زیر ۴ و بالای ۹ رشد نمی کند. میزان توده

زیستی در pH ۷/۵ در مقایسه با pH ۶/۵ به طور قابل توجهی کمتر است، زیرا با تغییرات pH توانایی میکروارگانیسم برای مصرف منبع کربنی کاهش می یابد.

در تحقیقی که توسط Jin و همکاران در سال ۲۰۰۸ انجام گرفت نشان دادند که کاهش دور همزن از ۱۸۰ دور در دقیقه به ۴۰ باعث افزایش میزان تولید محصول در اواخر فرآیند تخمیر می شود، زیرا

میکروارگانسیم پیر شده و حساسیت شدیدی به همزدن دارد از این رو کاهش دور همزن باعث افزایش محصول می شود.

در تحقیقی Jang و همکاران ۲۰۰۵ به بررسی تأثیر شرایط مختلف کشت بر تولید اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه توسط مورتیرلا آلپینا<sup>۱</sup> پرداختند. مشاهده شد که وزن خشک سلولی با افزایش غلظت نشاسته و گلوکز افزایش می یابد. در غلظت نشاسته ۱۰٪ و غلظت گلوکز ۶٪ به ترتیب به بیشترین مقدار ۱۸/۴ g/L و ۱۴/۹ g/L می رسد. وزن خشک سلولی به آرامی در غلظت نشاسته بیشتر از ۱۲٪ و به سرعت در غلظت گلوکز بیشتر از ۸٪ کاهش می یابد.

در تحقیقی Hwang و همکاران در سال ۲۰۰۵ مشاهده شد که در مورتیرلا آلپینا مقدار آراشیدونیک اسید به موازات افزایش مدت زمان، بیشتر می شود و در روز ۶ به حداکثر (۴/۸ g/L و ۴۲٪ کل اسیدهای چرب) می رسد.

قارچ مورتیرلا آلپینا به عنوان قارچی روغنی و تولید کننده آراشیدونیک اسید شناخته شده است. استخراج لیپید از زیست توده مرطوب و خشک در این قارچ مورد مطالعه قرار گرفت. عملکرد لیپید استخراج شده از سلول های خشک بیشتر از استخراج مرطوب بود، در استخراج مرطوب چربی به طور مؤثر از غشاء دریافت نشد. اگر چه در استخراج چربی ها در روش خشک و مرطوب اغلب از مواد بیولوژیکی تازه استفاده می شود، برای استخراج چربی ها میسلیم تازه مناسب نیست، این ممکن است ناشی از تفاوت بین مواد بیولوژیکی باشد (Zhu et al., 2002).

در تحقیقی Lan و همکاران در سال ۲۰۰۲ تأثیر افزایش گلوتامات در محیط کشت را بر رشد سلولی، فعالیت آنزیم گلوکز ۶-فسفات دهیدروژناز<sup>۲</sup> و تولید آراشیدونیک اسید در مورتیرلا آلپینا بررسی کردند. مشاهده شد که تولید توده زیستی و آراشیدونیک اسید در محیط های کشت دارای گلوتامات (۰/۸ g/L)

<sup>۱</sup> *Mortierella alpina* ATCC 32222

<sup>۲</sup> Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH)

نسبت به گروه کنترل بیشتر بود و پس از ۷ روز به ترتیب به ۲۵ g/L و ۱/۴ می‌رسد. افزودن گلوتامات موجب کاهش اولئیک، گاما لینولنیک و دی همو گاما لینولنیک اسید می‌شود در حالی که لینولئیک و آراشیدونیک اسید افزایش می‌یابند. افزودن ۰/۸ g/L گلوتامات بدلیل فعال نمودن مسیر متابولیکی پنتوز فسفات، تولید آراشیدونیک اسید را تشدید می‌کند.

Koike و همکاران در سال ۲۰۰۱ به این نتیجه رسیدند که نسبت کربن به نیتروژن برای تولید بهینه آراشیدونیک اسید توسط مورتیرا آلیپنا CBS754.68 دارای اهمیت می‌باشد. ریخت شناسی گوچه ای هنگامی که نسبت کربن به نیتروژن کمتر از ۲۰ بود تغییری نکرد البته اندازه ی گوچه ها با افزایش نسبت کربن به نیتروژن بالاتر از ۲۰ افزایش یافت و توده سلولی و آراشیدونیک اسید به ترتیب در محدوده ی ۳۰-۴۰ g/l و ۳/۵-۲ بعد از ۱۰ روز گرمخانه گذاری در ۲۸ درجه سانتیگراد به دست آمد. آن ها نسبت بهینه کربن به نیتروژن را برای تولید آراشیدونیک اسید در محیط کشت مورتیرا آلیپنا CBS754.68 در محدوده ۱۵-۲۰ گزارش کردند.

Jang و همکاران در سال ۲۰۰۰ به بررسی تولید اسیدهای چرب غیر اشباع توسط مورتیرا آلیپنا با استفاده از سبوس برنج و گندم، کنجاله بادام زمینی و کنجاله سیب زمینی شیرین را پرداختند. در این مطالعه در نسبت کربن به نیتروژن نزدیک به ۲۰ و گرمخانه گذاری ۵ روز در ۲۰ درجه سانتیگراد و سپس ۵ روز در ۱۲ درجه سانتیگراد، در استفاده از سبوس برنج بیشترین میزان آراشیدونیک اسید و ایکوزاپنتانوئیک اسید به دست آمد.

در تحقیقی Totani و همکاران (۲۰۰۰b)، املاح مورد نیاز در کشت مورتیرا آلیپنا را مورد بررسی قرار دادند. آن ها دریافتند که فسفر، پتاسیم، آهن و منگنز برای رشد سلولی ضروری هستند و آهن و منگنز نقش مهمی در تولید لیپید ایفاء می‌کنند. بدلیل افزودن تنها آهن یا تنها منگنز اثر منفی نیز مشاهده شد.

Fujikawa و همکاران در سال ۱۹۹۹ مشاهده کردند که مورتیرلا آلپینا را علاوه بر همزدن به ترتیب با افزایش فشار اکسیژن و هوای غنی از اکسیژن گرمخانه گذاری کرده و دریافتند که بهترین غلظت اکسیژن محلول برای تولید آراشیدونیک اسید ppm ۱۵-۱۰ می باشد.

در تحقیقی Park و همکاران در سال ۱۹۹۹، تأثیر منابع مختلف نیتروژنی مانند عصاره مخمر، کنجاله سویا، شربت ذرت خیسانده<sup>۱</sup>، فارمامدیا<sup>۲</sup>، پروتئین ماهی و پروتئین گلوتن را بر تولید آراشیدونیک اسید و ریخت‌شناسی میسلومی مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها دریافتند گویچه‌های نرم و صاف<sup>۳</sup> (یا گویچه‌های کروی) هنگامی که از عصاره مخمر، پروتئین گلوتن یا شربت ذرت خیسانده استفاده شود، بدست می‌آیند و گویچه‌های کرکی<sup>۴</sup> (یا گویچه‌های پر مانند، ریخت‌شناسی شعاعی) هنگامی که از کنجاله سویا، فارمامدیا یا پروتئین ماهی استفاده می‌شود، بدست می‌آیند. در اثر نتایج بدست آمده از ارتباط بین تولید آراشیدونیک اسید و نوع ریخت‌شناسی، پیشنهاد شده است که ریخت‌شناسی گویچه‌ای کرکی برای تولید آراشیدونیک اسید نسبت به ریخت‌شناسی گویچه‌ای نرم و صاف، مناسب تر می باشد. در مطالعه‌ای که توسط Higashiyama و همکاران (۱۹۹۸) برای افزایش تولید آراشیدونیک اسید توسط قارچ مورتیرلا آلپینا 1S-4 انجام گرفت، مشخص شد که محیط کشت دارای عصاره مخمر نسبت به محیط کشتی که دارای کنجاله سویا می‌باشد، مناسب‌تر است ولی هنگامی که برخی املاح به محیط کشت پایه افزوده شد، مشاهده شد محیط کشت دارای کنجاله سویا نسبت به محیط کشتی که دارای عصاره مخمر است، مناسب‌تر می باشد.

---

<sup>1</sup> Corn steep liquor (CSL)

<sup>2</sup> Pharmamedia

<sup>3</sup> Smooth pellets

<sup>4</sup> Circullar pellets

<sup>5</sup> Fluffy pellets



مطالعات انجام گرفته در مورد بازدهی آراشیدونیک اسید در بعضی بازدهی بیشتر از ۱۰ g/L گزارش شده است و موجب این پیشنهاد شده که مورتیرا آلپینا قابلیت زیادی برای تولید آراشیدونیک اسید دارد (Singh and Ward, 1997; Higashiyama et al., 1998).

در مطالعه ای Molin و Lindberg در سال ۱۹۹۳ به بررسی تأثیر دما و گلوکز برای تولید ایکوزاپنتانویک اسید توسط مورتیرا آلپینا CBS 343.66 در هنگام رشد در محیط های بزرگ پرداختند. pH مطلوب برای تولید آراشیدونیک اسید و روغن pH ۶/۵ در ۲۵ درجه سانتیگراد بود در حالی که تولید آراشیدونیک اسید در دمای ۱۲ درجه سانتیگراد به حداقل رسیده است. تولید ایکوزاپنتانویک اسید و گاما لینولنیک اسید حداکثر در ۱۲ درجه سانتیگراد بود. تولید لیپید با افزایش میزان گلوکز و محیط محدود محیطی بهینه شده است. عملکرد آراشیدونیک اسید با کاهش گلوکز به حداکثر می رسد.

در تحقیقی Shinmen و همکاران در سال ۱۹۸۹ نشان دادند که برای تولید آراشیدونیک اسید توسط مورتیرا، بهترین غلظت گلوکز در مقادیر ثابت غلظت عصاره مخمر (۰.۱٪)، ۲-۴٪ می باشد و تولید آراشیدونیک اسید به ۸-۱۰ mg/mL می رسد. زمانی که از شربت ذرت در غلظت ۰.۱٪ به عنوان منبع نیتروژنی استفاده می شود، بهترین غلظت گلوکز ۲٪ می باشد و تولید ۰/۶۵ mg/mL آراشیدونیک اسید می کند. در این حالت، افزایش بیشتر غلظت گلوکز، موجب کاهش زیادی در مقدار آراشیدونیک اسید تولیدی در میسلوم می شود. همچنین این محققین نشان دادند که برای تولید آراشیدونیک اسید، بهترین غلظت عصاره مخمر در مقادیر ثابت (۲٪ و ۴٪) گلوکز، ۰.۱٪ می باشد. افزایش بیشتر عصاره مخمر باعث کاهش قابل توجهی در تولید آراشیدونیک اسید می شود.

## ۲-۲ مروری بر پژوهش های درونپوشانی و اکسیداسیون

Atarian و همکاران در سال ۲۰۱۹ به بررسی پایداری اکسیداتیو امولسیون پیکرینگ روغن آفتابگردان تثبیت شده توسط نانوذله کیتوزان-استتاریک اسید و تثبیت امولسیون Tween 80 با استفاده از آزمون

های پراکسید و اسید تئوباربیتوریک پرداختند. یافته ها نشان داد که امولسیون O/W با تثبیت توسط نانوذله های کیتوزان-استئاریک اسید دارای پایداری اکسایش بیشتری نسبت به امولسیون O/W که با Tween 80 تثبیت شده است (Atarian et al., 2019).

Damasceno و همکاران در سال ۲۰۱۸ اسانس روغن را در نانوذله کیتوزان-پی کوماریک انکپسوله کردند. نتایج نشان داد، انکپسولاسیون اسانس روغن توسط نانوذله باعث بهبود عملکرد آنتی اکسیدانی می شود. فرآیند کپسوله سازی ممکن است منجر به حفاظت از ترکیبات فعال اسانس روغن شود و پراکندگی را در محیط آبی افزایش دهد که امکان استفاده از مواد سنتز شده در پوشش آن را حمایت می کند (Damasceno et al., 2018).

Feng و همکاران در سال ۲۰۱۶ بهبود خصوصیت دسترسی زیستی زردچوبه در نانوذله های اوآلبومین-دکستران که بوسیله واکنش های میلارد تهیه شد را مورد بررسی قرار دادند. مطابق نتایج، تغییر شکل زردچوبه در نانوذله ها به طور قابل توجهی بیشتر از نانوذرات اوآلبومین بود. به عبارت دیگر، دسترسی زیستی زردچوبه در نانوذله و نانوذرات شبیه به هم بود. همچنین نانوذله اوآلبومین-دکستران دارای پتانسیل بالقوه ای به عنوان حامل برای مغذی سازی غذاها و نوشیدنی ها بوده است (Feng et al., 2016).

Sharma و همکاران در سال ۲۰۱۶ به بررسی نانوذله به عنوان یک ابزار پیشرفته تحویل دارو پرداختند. هدف از این بررسی، بدست آوردن اطلاعات کامل در مورد نانوذله، روش سنتز و کاربرد آن در رشته های مختلف بود (Sharma et al., 2016).

Dridi و همکاران در سال ۲۰۱۶، تأثیر فرمولاسیون بر روی پایداری اکسیداتیو امولسیون های آب در روغن و نیز اکسیداسیون این امولسیون ها و همچنین تأثیر یون های اکسید کننده در فاز آبی بر روی اکسیداسیون لیپید امولسیون های آب در روغن را ارزیابی کردند. نتایج نشان داد که چنگالی کردن آهن باعث کاهش سرعت اکسیداسیون می شود (Dridi et al., 2016).

Wang و همکاران در سال ۲۰۱۵ در تحقیقی کورکومین را در نانوذرات زئین/کیتوزان درونپوشانی کردند و در ادامه به منظور پایداری امولسیون روغن در آب استفاده شد. نتایج ارزیابی پایداری اکسیداتیو نشان داد که این نانو ذرات باعث افزایش پایداری اکسیداتیو امولسیون شده اند.

Esquerdo و همکاران در سال ۲۰۱۵، در تحقیقی تحت عنوان آماده سازی نانوامولسیون های حاوی اسیدهای چرب غیراشباع کیسوله شده با کیتوزان، به آماده سازی نانوکپسول ها با روش امولسیون پرداختند. ۴ امولسیون با تفاوت در ترکیبات غلظت کیتوزان و زمان های هموژنیزاسیون استفاده شدند. نتایج نشان داد که نانوکپسول ها باعث ایجاد یک شکل کروی می شوند. به کارگیری غلظت کم مواد دیواره و زمان بالای هموژنیزاسیون نانوکپسول هایی با کوچکترین اندازه و کمترین شاخص پلی دیسپرسیون فراهم می کند. مقادیر پراکسید نشان داد که میکروساختار قادر به محافظت اسیدهای چرب غیراشباع از اکسیداسیون اولیه می باشند (Esquerdo et al, 2015).

Zhaveh و همکاران در سال ۲۰۱۵، به مطالعه انکپسولاسیون روغن های ضروری زیره سیاه در نانوزل کیتوزان-اسید کافئیک با فعالیت ضد میکروبی افزایش یافته در برابر آسپرژیلوس فلاووس پرداختند. نتایج نشان داد، به دلیل فراریت و ناپایداری روغن ها هنگامی که در معرض فاکتورهای محیطی قرار گرفتند، انکپسولاسیون به طور قابل توجهی عملکرد آن را در غلظت کمتر بهبود بخشید (Zhaveh et al., 2015).

Berton-Carabin و همکاران در سال ۲۰۱۴، اکسیداسیون لیپید در امولسیون روغن در آب و مشارکت لایه عرضی در این واکنش را مورد بررسی قرار دادند. در این تحقیق، کنترل محل واکنش در ماتریس غذا به عنوان راه حل جایگزین برای استفاده از آنتی اکسیدان ها بویژه آنتی اکسیدان های سنتزی به منظور جلوگیری از اکسیداسیون مطرح شد (Berton-Carabin et al, 2014).

Sun و همکاران در سال ۲۰۱۱، به بررسی اتواکسیداسیون لیپیدهای غیر اشباع در امولسیون های غذایی روغن در آب پرداختند. در این تحقیق اتواکسیداسیون لیپیدهای غیر اشباع در امولسیون روغن در آب و

همچنین مکانیسم های دیگر اکسیداسیون، بیشترین فاکتورهای تأثیرگذار بر روی اکسیداسیون، مشکلات و استراتژی های مؤثر برای کنترل اکسیداسیون لیپیدها در امولسیون های غذایی مورد بررسی قرار گرفت (Sun et al, 2011).

Kargar و همکاران در سال ۲۰۱۱، در پژوهشی تأثیر میکروساختارهای بین سطحی بر روی پایداری اکسیداتیو امولسیون های روغن در آب را مورد بررسی قرار دادند. بدین منظور پایداری اکسیداتیو امولسیون های پایدار شده با سدیم کازئینات، توئین ۲۰ و ذرات سیلیکا را با اندازه گیری محصولات اولیه و ثانویه را بررسی کردند. نتایج نشان داد که کاهش کسر روغنی از ۳۰ درصد به ۵ درصد، اکسیداسیون لیپیدها را به علت افزایش مقدار پراکسیداسیون لیپیدها را به علت خاصیت چگالی کننده فلزات در pH=7، اکسیداسیون لیپیدها را کاهش داد. همچنین امولسیون های پایدار شده با ذرات سیلیکا در pH=2 بهتر از امولسیون های پایدار شده با سورفکتانت ها از اکسیداسیون جلوگیری کردند (Kargar et al, 2011).

## ۲-۳ مروری بر پژوهش های امولسیون پیکرینگ و پایداری آن

Zhang و همکاران در سال ۲۰۱۷ فاکتورهای مؤثر در پایداری و نوع امولسیون پایدار شده با هیدروکسی اپتایت مورد مطالعه قرار دادند. با توجه به نتایج بدست آمده، پایداری امولسیون با افزایش غلظت هیدروکسی اپتایت، سرعت و زمان امولسیفیکاسیون افزایش یافت. همچنین، زمانی که pH در ۱۰ تنظیم شد بیشترین پایداری بدست آمد. با تنظیم پارامترها هر دو امولسیون W/O و O/W حاصل شد (Zhang et al., 2017).

Binks و همکاران در سال ۲۰۱۷ پایداری سازی پیکرینگ غذایی کف ها بوسیله هیدروفوب کردن ذرات کلسیم کربنات مورد مطالعه قرار دادند. در این پژوهش، به دلیل آنکه کلسیم کربنات دارای خاصیت هیدروفیلیکی و عدم فعالیت سطحی بود با استفاده از امولسیفایرهایی با بار منفی و دارای منشاء غذایی

عمل هیدروفوب کردن بر روی آن صورت گرفت. نتایج نشان داد، استفاده از چنین ذرات کلسیم کربنات موجب پایداری زیاد کف های آبی شد (Binks et al., 2017).

Mwangi و همکاران در سال ۲۰۱۶ در تحقیقی از امولسیون پیکرینگ روغن در آب به عنوان الگو و با استفاده از روشی آسان، برای شکل گیری میکروکپسول های کیتوزان با اتصالات عرضی یونی در pH های مختلف استفاده کردند. مطابق نتایج بدست آمده، اندازه میکروکپسول ها و اتصالات عرضی تحت تأثیر pH قرار داشت (Mwangi et al., 2016).

Frelichowska و همکاران در سال ۲۰۱۰، به مطالعه تأثیر مقدار ذرات جامد در ویژگی های امولسیون پیکرینگ روغن در آب پرداختند. در این تحقیق کنترل اندازه قطرات و پایداری امولسیون های پیکرینگ روغن در آب پایدار شده با ذرات سیلیکا مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد در نسبت کم سیلیکا به روغن امولسیون هایی با پایداری کم و در غلظت بالای سیلیکا امولسیون هایی با اندازه قطرات ثابت تشکیل شدند (Frelichowska et al., 2010).

## ۲-۴ مروری بر پژوهش های رئولوژی و زاویه تماس

در مطالعه ای توسط Li و همکاران، خواص رئولوژیکی نمونه های امولسیون پیکرینگ نانوذله کیتوزان هیدروکلراید-کربوکسی متیل نشاسته (CHC-CMS) با درصد های مختلف مورد بررسی قرار دادند. یکی از مهمترین عوامل امولسیون های پیکرینگ خواص رئولوژیکی آن ها است که نشان دهنده پایداری و عملکرد آن ها است. نتایج نشان داد که فازهای بالاتر روغن به تدریج منجر به افزایش  $G'$  و  $G''$  می شود، که این به ساختار محکم بسته کمک می کند که این نتایج مشابه نتایج Xiao و همکاران در سال ۲۰۱۶ و Dai و همکاران در سال ۲۰۱۸ بود که هر دو مدول  $G'$  و  $G''$  از امولسیون های پیکرینگ به طور مثبت با محتوای روغن مرتبط بودند. علاوه بر این هر دو مدول وابستگی اندکی به کل دامنه فرکانس

برای همه امولسیون های پیکرینگ نشان دادند، که نشان می دهد تعامل فیزیکی غیر کووالانسی عمدتاً مسئول شکل گیری شبکه شبیه به ژل امولسیون ها می باشد (Li et al., 2019).

Cortes-Trivino و همکاران در سال ۲۰۱۸ به مطالعه ای بر روی پالپ سلولز اپوکسی شده در روغن کرچک پرداختند. نتایج نشان داد در تمام نمونه ها  $G'$  را به طور قابل توجهی بالاتر از آنچه که برای  $G''$  در محدوده فرکانسی مورد مطالعه قرار گرفته است می باشد که منطقه فلات توسط ژل های ذرات کلوئیدی نمونه می باشد. که باید اینگونه توضیح داده شود با توجه به سازگاری بیشتر روغن کرچک به خاطر واکنش های شیمیایی گروه های اپوکسی آزاد باقی مانده در گروه های هیدروکسیل روغن کرچک می باشد، اگر چه در مقادیر بالاتر از ۳/۶ شاخص اپوکسی مقدار کمی افزایش در  $G'$  و  $G''$  مشاهده شد که به تعادل بین پالپ سلولز و روغن کرچک و تشکیل یک شبکه گسترده متقابل ارتباط داده شده است (Cortés-Trivino et al., 2018).

در مطالعه ای Martinez-Padilla و همکاران در سال ۲۰۱۷ خواص ویسکوالاستیک پوره آوکادو تازه آماده شده با عملیات دستی و مکانیکی مورد بررسی قرار دادند. طیف های مکانیکی در ۲۵ درجه سانتی گراد نشان داد که  $G'$  بیشتر از  $G''$  است که نشان دهنده غلبه رفتار جامد الاستیک بر ویسکوز می باشد. علاوه بر این هر دو مدول وابستگی اندکی به فرکانس زاویه ای اعمال شده بدون قطع شدن نشان دادند و اختلاف در مدول ها می تواند ناشی از تفاوت در فرآیند آمادسازی یا تنوع نمونه ها باشد (Martínez-Padilla et al., 2017).

در مطالعه ای تأثیر نسبت های مختلف ترکیبات سیمواستاتین-آرژینین (SMV-ARG) و اترواستاتین-آرژینین (ATV-ARG) را بر میزان رطوبت پذیری سطح مورد بررسی قرار دادند. رطوبت پذیری تمامی نمونه ها از طریق اندازه گیری زاویه تماس با استفاده از تکنیک جذب قطره آب بررسی شد. نتایج نشان داد که در مقادیر بالای ARG در نمونه های (ATV-ARG) منجر به کاهش مقدار زاویه تماس می

شود. این نشان داد که حضور ARG نقش مهمی در کاهش هیدروفوبیسیته و افزایش قابلیت رطوبت پذیری نمونه ها داشت (Affandi et al., 2017).

در مطالعه انجام شده توسط Ji و همکاران در سال ۲۰۱۶ چند پودر آگلومره و استاندارد شامل کازئین میسلار (MC)، پروتئین شیر ایزوله شده (MPI) و پروتئین آب پنیر ایزوله شده (WPI) را از نظر زاویه تماس و جذب قطره آب مورد مقایسه قرار دادند نتایج نشان داد که، پودر های آگلومره معمولاً نسبت به پودرهای معمولی زودتر آب جذب می کنند زیرا قطره به راحتی می تواند بین ذرات پودر نفوذ کند و آن را سریعتر خیس کند (Ji et al., 2016).





## فصل سوم

### مواد و روش ها

### ۳-۱ مواد اولیه مورد استفاده

سولفات منیزیم ۷ آبه (۰/۵ گرم بر لیتر)، کلرید کلسیم ۲ آبه (۰/۱ گرم بر لیتر) و دی پتاسیم هیدروژن سولفات ۳ آبه (۴ گرم بر لیتر)، محیط کشت PDA، گلوکز تک آبه، عصاره مخمر، هگزان نرمال، مالت آگار، هیدروکسید سدیم، استیک اسید، کیتوزان، استئاریک اسید، کاپریک اسید، متانول از شرکت مرک آلمان خریداری شد. کلرید آهن از شرکت سیگما آلد ریج آلمان، آمونیوم تیوسیانات و کلروفرم از شرکت سامچون کره تهیه شد، ۱-اتیل-۳-دی متیل آمینو پروپیل) کربو دی ایمید (EDC) از شرکت فولوکا آمریکا، سویای مورد استفاده در فرایند تخمیر از کارخانه به پاک خریداری و پس از خرد و الک شدن در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگه داری شد.

### ۳-۲ تجهیزات مورد استفاده

- ۱) اتوکلاو مدل RT-21 (۷۵ لیتری) ساخت شرکت ریحان طب کشور ایران
- ۲) آون مدل Memmert ساخت شرکت آلمان
- ۳) انکوباتور مجهز به سامانه همزن ساخت شرکت Pars Azma co (1597) ساخت کشور ایران
- ۴) دستگاه اولتراسوند Elmasonic E 30/H ساخت کشور آلمان
- ۵) دستگاه pH متر Mettler ساخت کشور سوئیس
- ۶) سانتریفیوژ Eppendorf 5810 ساخت کشور آلمان
- ۷) مخلوط کن Black & Decker ساخت کشور انگلستان
- ۸) ترازو مدل Sartorius TE124S ساخت کشور آلمان
- ۹) هاون آزمایشگاهی
- ۱۰) رئومتر Anton-Paar ساخت کشور اتریش
- ۱۱) هیتز IKA C-MAG HS ۷
- ۱۲) میکروسکوپ نوری GX، ژاپن

- ۱۳) طیف سنجی مادون قرمز (FTIR) (مدل (AVATAR 370 (USA))
- ۱۴) میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی (FE-SEM) (مدل MAIA3)
- ۱۵) دستگاه اسپکتروفتومتری نور مرئی UV۲۱۵۰ (UNICO، امریکا)
- ۱۶) سمپلر در اندازه های مختلف ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتر (Aiton، چین)
- ۱۷) همزن دستی با دور موتور ۵۵۰۰ دور در دقیقه

### ۳-۳ روش ها

#### ۳-۳-۱ روش نگهداری میکروارگانیزم ها

در این تحقیق از قارچ مورتیرلا آلپینا سی بی اس ۱۷۵۴/۶۸ به دلیل تولید مقادیر بالایی ۴۰٪ آراشیدونیک اسید و تولید روغن بیشتر از ۴۰٪ استفاده شد (Samadlouie et al., 2014). پس از خریداری از مجموعه میکروبی کشور هلند بصورت میسلیم در لوله آزمایش آگار شیب دار<sup>۳</sup>، روی محیط کشت مالت آگار در بشقابک<sup>۴</sup> و لوله آزمایش آگار شیب دار در درجه حرارت ۲۲°C و مدت زمان ۷ روز کشت داده شد و سپس در یخچال با درجه حرارت ۳°C نگهداری شد. کشت مجدد میکروارگانیزم هر شش ماه یک بار برای نگهداری آن انجام شد.

#### ۳-۳-۲ مایه تلقیح و کشت های اصلی

از سوسپانسیون میسلیمی برای تلقیح کشت های تولید محصول استفاده شد (Zhu et al., 2003). برای تهیه سوسپانسیون میسلیمی، ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت شامل گلوکز تک آبه (۳۰ g/L) و عصاره مخمر (۱۰ g/L) در یک ارلن ۵۰۰ میلی لیتری تهیه شد، در درجه حرارت ۱۲۱°C و ۱۵ دقیقه سترون گردید. سپس بوسیله آنس سترون میکروارگانیزم را تلقیح کرده و در درجه حرارت ۲۶°C به مدت ۷۲

1- *Mortierella alpina* CBS 754.68

2- Centraalbureau voor Schimmelcultures

3- Slant agar

4- Petri dish

ساعت و ۱۷۰ دور بر دقیقه<sup>۱</sup> گرمخانه گذاری شد (Singh and Ward, 1997). ۳ تا ۱۰٪ از کشت‌های توسعه تلقیح به‌عنوان مایه تلقیح به محیط کشت تولید محصول افزوده شد. در محیط‌های کشت تولید محصول از ارلن‌های ۵۰۰ میلی لیتری که شامل ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت می‌باشد، استفاده شد. نکته قابل توجه اینکه املاح معدنی مورد استفاده شامل سولفات منیزیم ۷ آب (۰/۵ گرم بر لیتر)، کلرید کلسیم ۲ آب (۰/۱ گرم بر لیتر) و دی پتاسیم هیدروژن سولفات ۳ آب (۴ گرم بر لیتر)؛ منبع پروتئینی استفاده شده عصاره مخمر مرک و از سویای پودر شده سبحان استفاده شد همچنین برای تنظیم pH از اسید کلریدریک و سود استفاده شد (Zhu et al., 2002 and 2003).

### ۳-۲-۳-۱ تهیه محیط کشت توسعه تلقیح

محیطی شامل ۳۰ gr/l گلوکز و ۱۰ gr/l پودر سویا تهیه شد. محیط به ارلن بافل دار انتقال یافت و پس از استریل شدن در اتوکلاو، توسط لوپ استریل از پلیت‌های حاوی مخمر نمونه در محیط تلقیح داده شد سپس در انکوباتور شیکر دار در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و با دور همزن ۲۰۰ rpm به مدت ۷ روز قرار گرفت (Samadlouie et al., 2014).

### ۳-۲-۳-۲ محیط کشت تولید محصول

محیطی شامل ۷۰ gr/l گلوکز، ۴ gr/l پودر سویا و ۴ gr/l عصاره مخمر تهیه شد (نسبت کربن به نیتروژن ۱۰ به ۱ بود). محیط به ارلن بافل دار انتقال یافت و پس از استریل شدن در اتوکلاو، ۳-۱۰ درصد حجم محیط کشت به محیط تولید محصول اضافه شد سپس در انکوباتور شیکر دار در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و با دور همزن ۲۰۰ rpm به مدت ۷ روز قرار گرفت (Samadlouie et al., 2018).

### ۳-۳-۳ استخراج توده زیستی

ارلن‌های حاوی توده زیستی (شکل ۳-۱) در محیط کشت فرموله شده (عصاره مخمر، سویا) در روز ۷ به لوله فالكون انتقال پیدا کرد، سپس با سانترفیوژ کردن در ۸۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۵ دقیقه توده

<sup>1</sup>- Revolution per minute (rpm)

زیستی از آب حاوی محیط کشت جدا گردید. سپس توده زیستی برای استخراج روغن مورد استفاده قرار گرفت (Samadlouie et al., 2014).



شکل ۳-۱: توده زیستی

### ۳-۳-۴ اندازه گیری وزن خشک سلولی

برای اندازه گیری وزن خشک سلولی، توده زیستی را بر روی شیشه ساعت قرار داده و به مدت ۲ ساعت در آون با درجه حرارت ۱۰۵ درجه سانتی گراد خشک گردید. سپس وزن آن با ترازو اندازه گیری شد (Sakuradani et al., 2004).

### ۳-۳-۵ استخراج لیپید

توده زیستی خشک شده پس از توزین به وسیله هاون آزمایشگاهی به پودر تبدیل کرده، زیرا برای استخراج لیپیدها بایستی که اندازه ذرات میسلایومها کوچک شود. نمونه پودری را در داخل فالكون ریخته، ۲ میلی لیتر حلال ان-هگزان به آن اضافه گردید (Folsch et al., 1957).

برای اینکه استخراج لیپید تا حد ممکن زیاد باشد، فالكون های آزمایش در دستگاه اولتراسوند به مدت ۳ ساعت قرار گرفت (Jang et al., 2005). سپس فالكون های آزمایش به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ

---

<sup>1</sup>- Dry cell weight (DCW)

(۴۰۰۰ دور بر دقیقه) شد. در (شکل ۳-۲) تصویر دستگاه سانتریفوژ نشان داده شده است. محلول بالایی که شامل لیپید و حلال ان-هگزان است را در یک لوله آزمایش تخلیه نموده و توسط گاز نیتروژن حلال آن تبخیر شد. گاز نیتروژن یک گاز بی‌اثر بوده و از اکسیداسیون لیپید جلوگیری می‌کند.



شکل ۳-۲: دستگاه سانتریفوژ

### ۳-۳-۶ مشتق سازی اسیدهای چرب

برای تعیین و اندازه‌گیری اسیدهای چرب، در ابتدا چربی بایستی به اسیدهای چرب و گلیسرول تجزیه شود. سپس توسط عمل مشتق سازی، متیله شده و به دستگاه گاز کروماتوگرافی تزریق شود. با توجه به عدم فراریت اسیدهای چرب بایستی مشتق های متیل استر آن ها را تهیه نمود. مشتق سازی اسیدهای چرب به روش Metcalf و همکاران (۱۹۹۶) انجام شد. برای این کار، ۵ میلی لیتر محلول سود متانولی ۲٪ به همراه یک میلی لیتر استاندارد داخلی پنتادوکونوئیک اسید (۲ mg/mL) به لوله های آزمایش که محتوی لیپید استخراج شده می‌باشند، افزوده و درب آن ها را محکم بسته، بشدت مخلوط کرده و ۱۰ دقیقه در آب در حال جوش قرار داده شد. سپس لوله های آزمایش زیر شیر آب سرد خنک شد. ۲/۱۷۵ میلی لیتر محلول تری فلور بورات به لوله های آزمایش اضافه کرده، بشدت مخلوط کرده و ۳ دقیقه در آب در حال جوش قرار داده شد. پس از خنک شدن لوله ها، ۱ میلی لیتر حلال ان-هگزان و ۱ میلی

لیتر محلول نمک اشباع به لوله های آزمایش اضافه شد و بشدت مخلوط گردید. پس از گذشت چند ثانیه، محلول لوله های آزمایش دو فاز تفکیک شد. فاز بالایی که شامل اسیدهای چرب متیله شده و حلال می باشد، توسط سمپلر در یک میکروتیوب تخلیه گردید و مقداری از حلال آنرا توسط گاز نیتروژن تبخیر کرده و تغلیظ گردید. میکروتیوب ها تا زمان تزریق به دستگاه کروماتوگرافی گازی در یخچال ( $4^{\circ}\text{C}$ ) قرار داده شد.

### ۳-۳-۷ آماده سازی نانوژل کیتوزان-استئاریک اسید و کیتوزان-کاپریک اسید

تهیه نانوژل به روش فراصوت و اتصال استئاریک اسید و کاپریک اسید به کیتوزان با تشکیل پیوند های آمیدی با یک واکنش دهنده (۱-اتیل-۳-(۳-دی متیل آمینو پروپیل) کربو دی ایمید (EDC) با روش ارائه شده توسط چن و همکاران (۲۰۰۳)، انجام شد (Chen et al., 2003). در ابتدا ۱ گرم کیتوزان در ۱۰۰ میلی لیتر اسید استیک آبی (۱ درصد حجمی/حجمی) حل شد. پس از افزودن ۸۵ میلی لیتر متانول، محلول حاصل تحت امواج فراصوت قرار داده شد. سپس ۴۰ میلی گرم EDC که با ۵ سی سی متانول مخلوط شده را به ۴۰۰ میلی گرم استئاریک اسید و کاپریک اسید مخلوط شده با ۵ سی سی متانول اضافه و مخلوط شد. سپس محلول آماده شده به مدت ۴۰ دقیقه در تاریکی قرار داده تا واکنش صورت گیرد و بعد از این مدت بر روی همزن با ۵۰۰ دور بر دقیقه محلول کیتوزان قطره قطره به نمونه اضافه شده، سپس محلول آماده شده را با فویل آلومینیوم مهر و موم کرده و در شیکر با ۱۹۰ دور بر دقیقه و دمای ۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده بعد از طی این زمان pH با استفاده از هیدروکسید سدیم (۱ مولار) برای آماده سازی نانوژل بر روی ۹-۸/۵ تنظیم شد. سپس مخلوط برای بهبود یافتن نانوژل آماده شده، سانتریفیوژ شد. نانوژل به دست آمده برای حذف مواد واکنش نداده توسط سود (۱ مولار) و اسید استیک (۰.۲٪) و آب مقطر شسته شد. محلول شفاف نانوژل در نهایت توسط فیلتر واتمن با مش ۰/۲ میکرومتر فیلتر شد.

### ۳-۳-۸ بررسی نانوژل کیتوزان

#### ۳-۳-۸-۱ آزمون FT-IR

طیف سنجی مادون قرمز یکی از پر کاربردترین روش ها در شناسایی کیفی مولکول های مختلف، تعیین ساختار مولکولی گونه مختلف (مخصوصاً گونه های آلی) و شناسایی گروه های عاملی موجود در ساختار یک گونه می باشد. در این پژوهش برای تأیید تشکیل ساختار نانوژل ها، طیف سنجی مادون قرمز در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد و در رنج  $cm^{-1}$  (۵۰۰ تا ۳۶۰۰) انجام داده شد (Khalili et al., 2015). برای این منظور از کیتوزان، استتاریک اسید، کاپریک اسید، نانوژل کیتوزان-کاپریک اسید و نانوژل کیتوزان-استتاریک اسید طیف FT-IR تهیه شد. برای تهیه طیف از هر ترکیب فیلم های خشک شده تهیه شد و سپس با پودر خالص برمید پتاسیم مخلوط شدند و سپس از آن ها قرص های فشرده تهیه گردید. طیف نمونه های مورد نظر با دستگاه اسپکتروسکوپی مادون قرمز مدل (AVATAR 370 (USA)) (شکل ۳-۳) اندازه گیری و بررسی شد.



شکل ۳-۳: دستگاه طیف سنجی مادون قرمز، FT-IR



### ۳-۳-۸-۲ آزمون میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی (FE-SEM)

مورفولوژی و سایز نمونه های کیتوزان اصلاح نشده، نانوذله های کیتوزان-کاپریک اسید و کیتوزان-استئاریک اسید با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی مورد بررسی قرار گرفت. برای انجام این آزمون سه قطره از نانوذله های تازه رقیق شده روی لام ریخته شد، بدین صورت که یک قطره از نانوذله تازه رقیق شده روی لام ریخته و خشک شد و سپس قطره های دیگر به همین ترتیب اضافه شدند و سپس در معرض هوا خشک و در ادامه نمونه ها با طلا پوشش داده شدند. سپس ویژگی های مورفولوژی نمونه ها توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی (FE-SEM)، مدل MAIA3 مورد بررسی قرار گرفتند.

### ۳-۳-۹ آماده سازی امولسیون های پیکرینگ

برای تهیه امولسیون های پیکرینگ از روغن مورتیرا آلپینا به عنوان فاز پراکنده، آب مقطر به عنوان فاز پیوسته و کیتوزان اصلاح نشده، نانوذله های کیتوزان-استئاریک اسید و کیتوزان-کاپریک اسید به عنوان پایدار کننده استفاده شد.

برای تهیه امولسیون های پیکرینگ ابتدا کیتوزان، نانوذله های کیتوزان-استئاریک اسید و کیتوزان-کاپریک اسید با غلظت مشخص، به روغن مورتیرا آلپینا اضافه کرده و به مدت یک دقیقه با همزن، همزده شدند. پس از آماده سازی سه نمونه امولسیون های پیکرینگ از آن ها با میکروسکوپ نوری مدل GX Microscopes، ساخت کشور ژاپن و دوربین دیجیتال ۷ مگاپیکسل پس از ۳ ساعت و پس از ۷ روز نگهداری در دمای محیط عکس گرفته شد، همچنین برای آزمون پراکسید و آزمون رئولوژی استفاده شد.

### ۳-۳-۱۰ بررسی پایداری امولسیون پیکرینگ

#### ۳-۳-۱۰-۱ تعیین اندازه ذرات

برای مشاهده شکل و اندازه ذرات امولسیون، از میکروسکوپ نوری مدل GX Microscopes، ساخت کشور ژاپن استفاده شد. در (شکل ۳-۴) تصویر میکروسکوپ نوری نشان داده شده است. برای آنالیز یک قطره از نمونه بر روی لام ریخته و یک عدد لامل بر روی آن قرار داده و زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰ و در دمای اتاق بررسی شد. از همه نمونه ها در روز اول (۳ ساعت بعد از آماده سازی) عکسبرداری شد.



شکل ۳-۴: میکروسکوپ نوری

برای سنجش اندازه ذرات امولسیون از نرم افزار image z استفاده شد (Cheong et al., 2016). به این صورت که پس از عکسبرداری با دوربین دیجیتال ۷ مگاپیکسل از نمونه های امولسیون در روز اول با استفاده از نرم افزار Adobe Photoshop CS5، خط مقیاس اندازه گیری شد و با قرار دادن در برنامه Image z میانگین اندازه ذرات امولسیون بدست آمد.

### ۳-۳-۱۰-۲ محاسبه ضریب خامه ای شدن (Creaming test)

ضریب خامه ای شدن امولسیون های پیکرینگ آماده شده و مورد ارزیابی قرار گرفت. به این صورت که ۲ میلی لیتر از هر نمونه امولسیون در داخل شیشه های آزمایش انتقال داده شد و درب آن ها بسته

شد تا از تبخیر آن ها جلوگیری شود و سپس در دمای اتاق به مدت ۷ روز نگهداری شدند. بعد از این مدت هر یک از امولسیون های درون شیشه، به یک لایه خامه ای غیر شفاف در قسمت بالایی شیشه و یک لایه سرمی شفاف در قسمت پایین شیشه تقسیم شدند. ضریب خامه ای شدن به طور غیر مستقیم اطلاعاتی درباره میزان انعقاد قطره در امولسیون و وضعیت پایداری امولسیون را در اختیار می گذارد. ضریب خامه ای شدن به وسیله فرمول (معادله ۳-۱) زیر و با استفاده از خط کش اندازه گیری و محاسبه شد:

$$\text{معدله (۳-۱)}: (CI)\% = (H_S/H_T) \times 100$$

در این فرمول  $H_T$  ارتفاع کل امولسیون و  $H_S$  ارتفاع لایه سرمی امولسیون می باشد. (Owens et al., 2018).

### ۳-۳-۱۱ تعیین ویژگی های رئولوژیکی

خواص رئولوژیکی امولسیون ها در ۲۵ درجه سانتیگراد با استفاده از یک رئومتر MCR-302 (ساخت شرکت Anton paar، اتریش) با سیستم اندازه گیری صفحات مخروطی اندازه گیری شد. در (شکل ۳-۵) تصویر رئومتر نشان داده شده است. برای هر اندازه گیری، امولسیون ها در صفحات قرار داده شدند و سپس به مدت ۵ دقیقه زمان لازم است تا تعادل دما قبل از اندازه گیری به دست آید. نمونه به صورت پیوسته از ۰/۱ تا ۱۰۰ درصد برش داده شد و بسامد ۱ rad/s برای یافتن منطقه خطی ویسکوالاستیک (با انجام آزمایش روبش دامنه) میزان فرکانس اعمال شده از ۰/۱ تا ۶۲۵ rad/s نوسان می باشد و فشار در ۱٪ تنظیم شده است. مدول ذخیره سازی ( $G'$ ) و مدول اتلاف ( $G''$ ) در مقایسه با فرکانس ثبت شد.



شکل ۳-۵: دستگاه رئومتر

### ۳-۳-۱۲ ارزیابی پایداری اکسیداتیو با آزمون پراکسید

عدد پراکسید، میزان هیدروپراکسیدهای تولید شده ناشی از واکنش های اولیه اکسیداسیون را نشان می دهد. محصولات اولیه اکسیداسیون موجود در نمونه ها مطابق با روش شانتا و دکر (۱۹۹۴) تعیین شد (Shantha and Decker, 1994). برای اندازه گیری عدد پراکسید پس از آماده سازی، محلول کلرید آهن (II) و محلول ۳۰ درصد تیوسیانات آمونیوم، ۹/۸ میلی لیتر کلروفورم/متانول (۳:۷ حجمی/حجمی) به ۱۰ میکرولیتر نمونه افزوده شد و ۲-۴ ثانیه مخلوط شد. در ادامه، ۵۰ میکرولیتر از محلول ۳۰ درصد آمونیوم تیوسیانات (وزنی/حجمی) افزوده و به مدت ۲-۴ ثانیه مخلوط شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از محلول کلرید آهن به نمونه افزوده شد. بعد از ۲۰ دقیقه جذب محلول رنگی با استفاده از اسپکتروفتومتر نور مرئی مدل UV۲۱۵۰ (Unico، امریکا) در طول موج ۵۰۰ نانومتر خوانده شد. در (شکل ۳-۶) تصویر اسپکتروفتومتر نور مرئی نشان داده شده است. محلول شاهد کلروفورم/متانول (۳:۷ حجمی/حجمی) بود. برای تهیه منحنی استاندارد غلظت های ۰/۵ تا ۳ میکرولیتر/لیتر کیومن تهیه و توسط اسپکتروفتومتری در طول موج ۵۰۰ نانومتر خوانده شد و در برنامه اکسل منحنی استاندارد (معادله (۲)) آن رسم گردید. عدد پراکسید (PV) به صورت میکرومول پراکسید در کیلوگرم روغن بیان شد (Waraho et al., 2011).

$$Y = 0.047 X + 0.016$$

معادله ۳-۲:

$Y =$  میزان جذب خوانده شده ،  $X =$  غلظت بر حسب میکرولیتر / لیتر



شکل ۳-۶: اسپکتروفوتومتر نور مرئی

### ۳-۳-۱۳ انحلال پذیری ذرات

زاویه تماس ( $\theta$ ) یک پارامتر اصلی برای اندازه گیری سطح جامد توسط یک مایع می باشد. زاویه تماس ( $\theta < 90^\circ$ ) نشان دهنده حلالیت بالای جامد است و زاویه تماس ( $\theta > 90^\circ$ ) نشان دهنده حلالیت پایین جامد است. رفتار انحلال پذیری یک فرآیند پویایی است که مایع به تدریج در پودر نفوذ می کند، که با مشاهده تغییرات زاویه تماس مشاهده می شود. اندازه گیری زاویه تماس با استفاده از قرار دادن یک قطره آب و زمان پخش شدن آن در سطح نمونه انجام شد. یک قطره ۲ میکرولیتری آب دیونیزه شده بر روی سطح نمونه امولسیون های (کیتوزان، نانوزل کیتوزان-استتاریک اسید و کیتوزان-کاپریک اسید) پودری به طور منظم برای انجام اندازه گیری های مؤثر در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. نمونه پودری توسط یک سطح دهنده برای اطمینان از ایجاد یک سطح صاف در هنگام اندازه گیری

زاویه مماس در نقطه تماس صاف شد. تغییر زاویه تماس به عنوان تابع زمان ثبت شد. لازم به ذکر است که هر نمونه پنج بار تکرار شد (Ji et al., 2016).

### ۳-۳-۱۴ تجزیه تحلیل داده ها

تمام آزمایشات در سه تکرار انجام شد. میانگین و انحراف استاندارد (SD) با استفاده از نرم افزار میکروسافت اکسل ۲۰۱۶ محاسبه شد. آنالیز واریانس یکطرفه و همچنین آزمون چند دامنه دانکن برای مقایسه اختلاف ها در سطح ۵٪ با نرم افزار SPSS 22 محاسبه گردید.

## فصل چهارم

### بحث و نتایج

#### ۴-۱ تعیین پروفایل اسیدهای چرب مورتیرا آلپینا

در جدول ۴-۱ پروفایل اسیدهای چرب حاصل از کروماتوگرافی گازی نشان داده شده است. نتایج حاصل از پروفایل اسیدهای چرب نشان می دهد که میزان اسیدهای چرب غیر اشباع روغن مورتیرا آلپینا در حدود ۶۸/۴۲ درصد می باشد که از این میزان حدود ۴۲/۰۴۲ درصد را اسیدهای چرب آراشیدونیک اسید تشکیل داده است. نتایج کیکوکاوا و همکاران در سال ۲۰۱۸ نشان داد که در روغن مورتیرا آلپینا میزان اسیدهای چرب آراشیدونیک اسید بین ۷۰-۳۰ درصد بود که با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارد (Kikukawa et al., 2018). همچنین با توجه نتایج لی و همکاران در سال ۲۰۱۵ میزان اسیدهای چرب آراشیدونیک اسید روغن مورتیرا آلپینا را بالاتر از ۴۰/۶۱ درصد بیان کردند (Li et al., 2015). استریکسترا و همکاران در سال ۱۹۹۷ میزان اسیدهای چرب آراشیدونیک اسید را بین ۵۰-۳۰ درصد تخمین زدند (Streekstra, H 1997). با توجه به اینکه روغن مورتیرا آلپینا غنی از اسیدهای چرب  $\omega$ -۳ و  $\omega$ -۶ می باشد و بیشترین میزان اسید چرب  $\omega$ -۶ را آراشیدونیک اسید تشکیل می دهد که، کاربرد گسترده ای در پزشکی، دارویی، لوازم آرایشی، صنایع غذایی، کشاورزی و سایر زمینه ها دارد (Ji et al., 2014)، همچنین اسیدهای چرب غیر اشباع برای حفظ غشاهای سلولی، عملکرد مغز و انتقال امواج عصبی، انتقال اکسیژن به پلاسمای خون در سنتز هموگلوبین و تقسیم سلولی شرکت می کنند و ضروری هستند زیرا آن ها توسط بدن تولید نمی شوند و به حفظ سلامت قلب و عروق کمک می کنند، همچنین ممکن است علائم بیماری مانند بیماری آلزایمر، اختلال روده مزمن و برخی از انواع سرطان را کاهش دهند (Oliveira Finco et al., 2016). با توجه به اینکه پیوندهای دوگانه نقش مهمی در اکسیداسیون دارند و باعث تسریع اکسیداسیون می شوند با در نظر گرفتن محتوی بالای آراشیدونیک اسید روغن مورتیرا این گونه روغنی شرایط فساد اکسیداتیو را داشته و در عین حال با در نظر گرفتن این نکته که روغن این گونه مورد نیاز کارخانه جات غذای کودک می باشد تهیه پورد این روغن مورد توجه دانشمندان بوده است. اسیدهای چرب چند غیراشباعی  $\omega$ -۳ اصولاً بدون مزه هستند، ولی در اثر اکسایش، محصولات غنی شده طعم نامطبوعی پیدا می کنند (Sheikhshoaei et al., 2013).



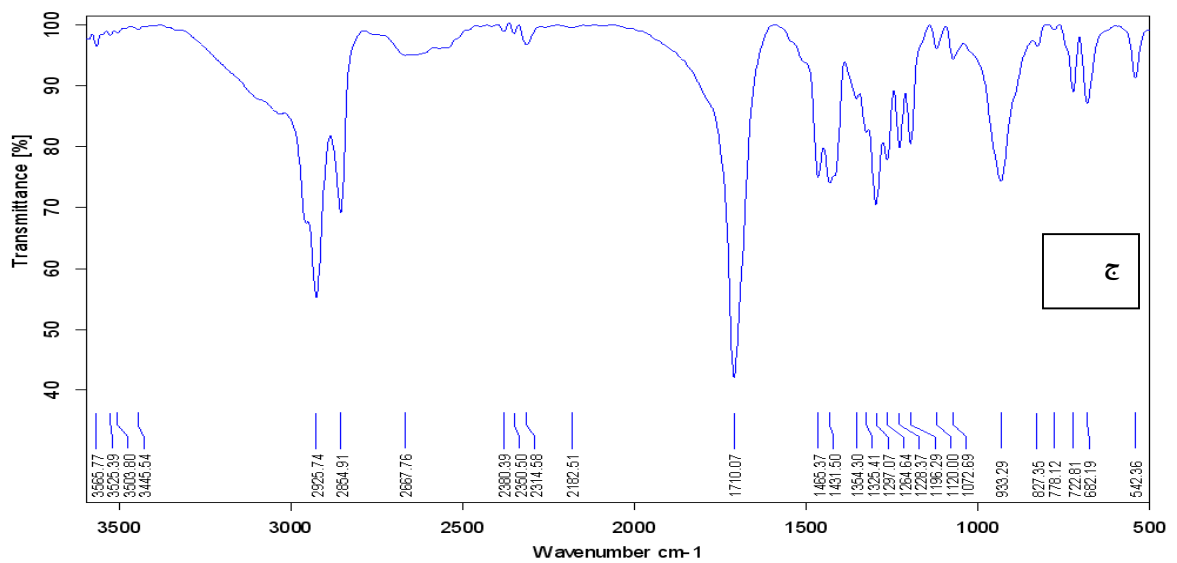
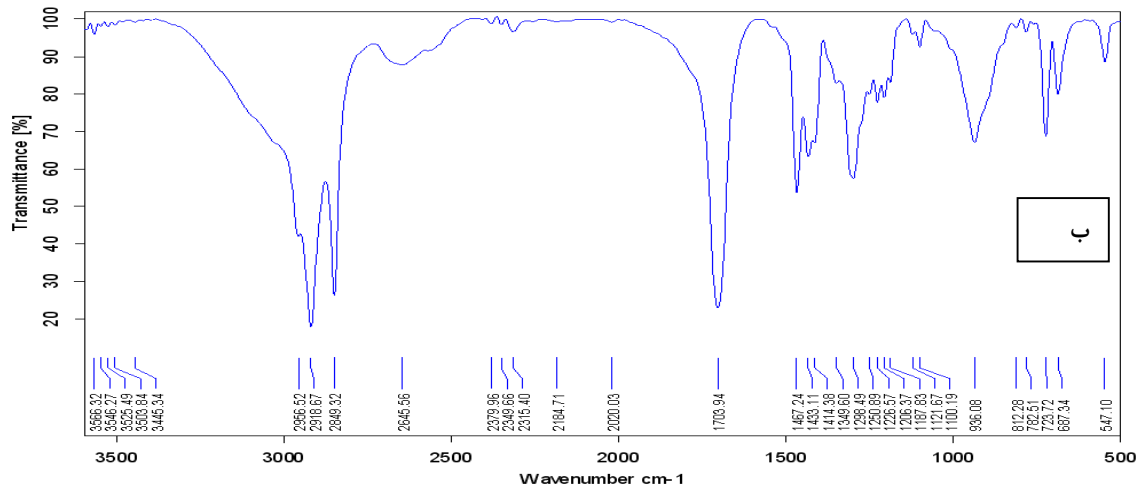
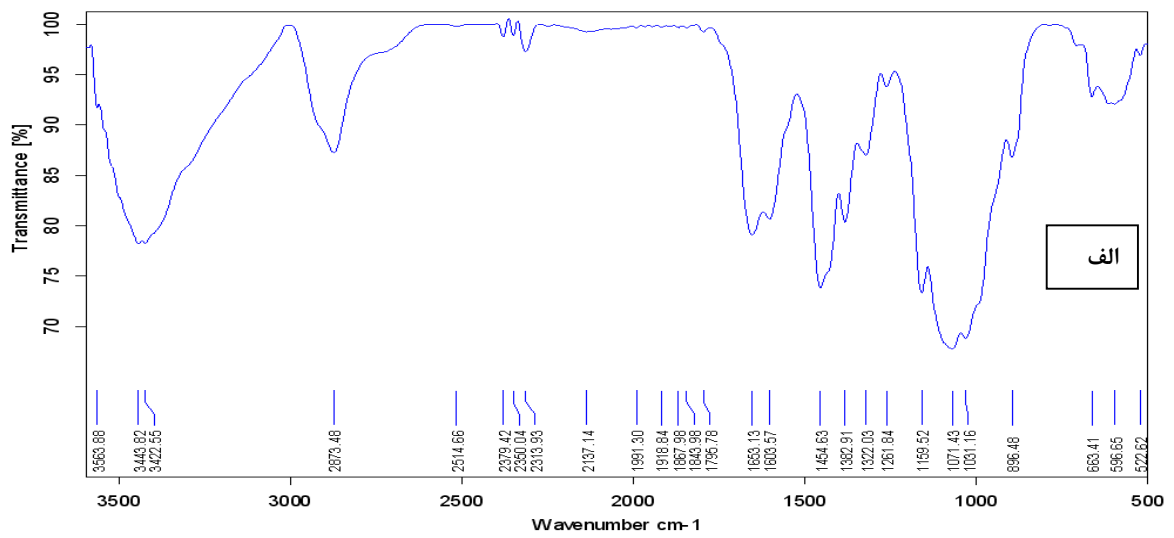
جدول ۴-۱: پروفایل و درصد اسیدهای چرب روغن مورتیرا آلپینا

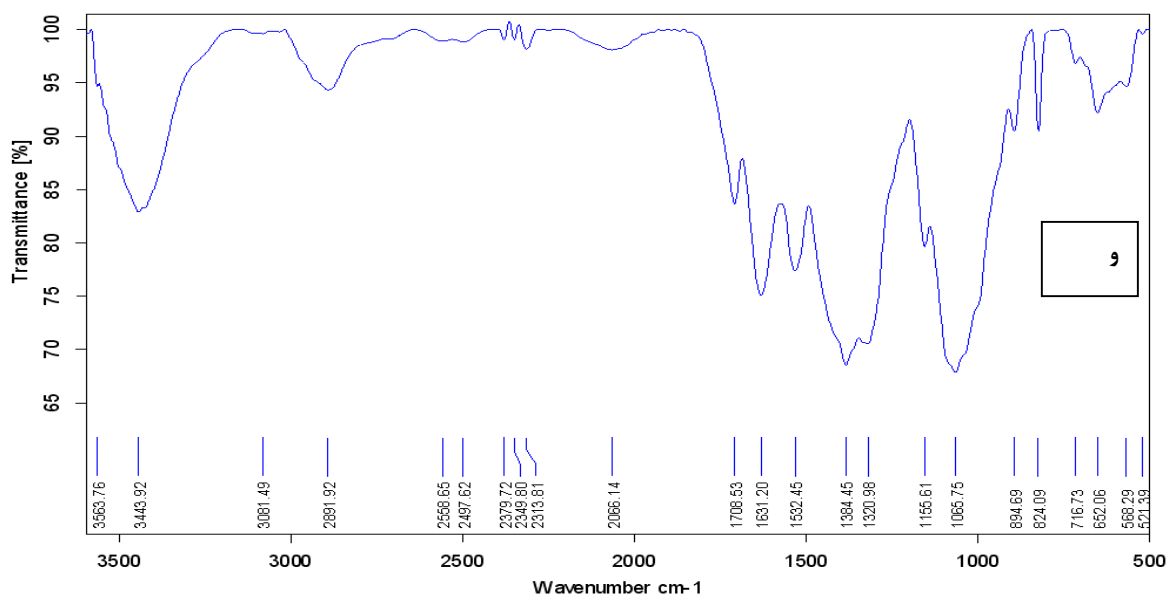
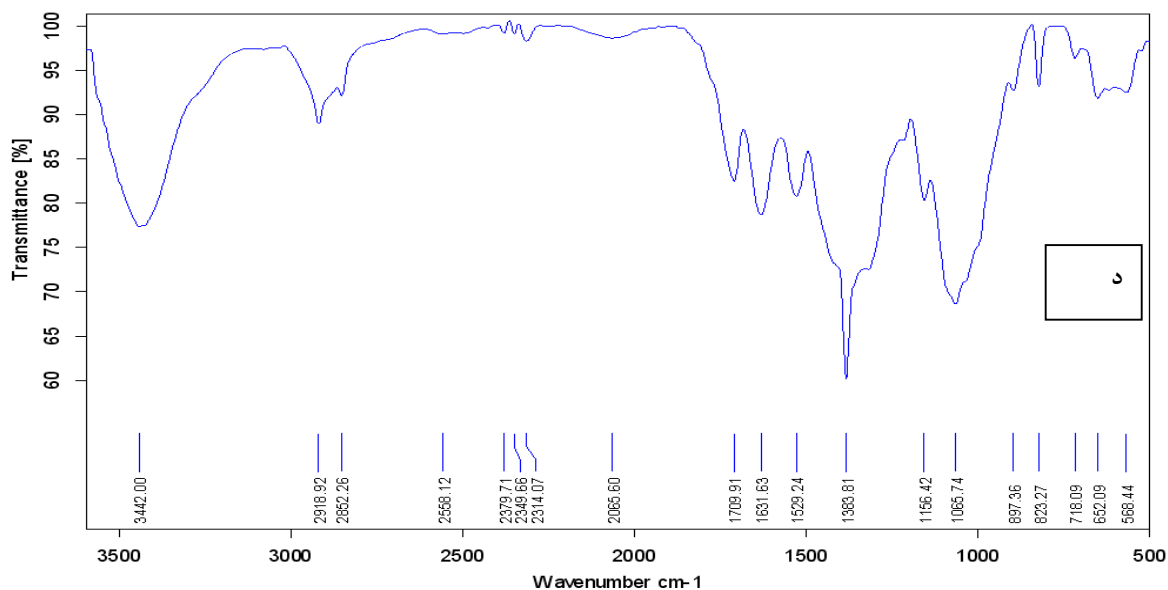
ترکیب	درصد
C14:0	۱/۳۰۷
C16:0	۱۵/۷۶۳
C16:1	۰/۱۸۰
C17:0	۰/۱۲۶
C18:0	۱۲/۵۴۱
C18:1(n-9)C	۷/۹۷۰
C18:2(n-6)C	۸/۳۰۷
C18:3 ω6	۳/۸۹۵
C18:3 ω3	۰/۱۸۱
C20:0	۰/۵۱۹
C20:3 ω3	۰/۶۹۰
C20:3 ω6	۲/۳۸۶
C20:4 ω6 ARA	۴۲/۰۴۲
C22:0	۱/۳۱۸
C20:5 ω3 EPA	۰/۶۷۰
C22:4 ω6 DTA	۲/۱۰۳

## ۲-۴ بررسی نانوژل

### ۱-۲-۴ نتایج FT-IR

در مرحله اول این تحقیق نانوژل با مکانیسم خود تجمعی، با استفاده از کیتوزان اصلاح شده تهیه گردید. به منظور اصلاح کیتوزان، قسمتی از گروه های آمینوی آزاد کیتوزان به گروه های استتاریک اسید و کاپریک اسید در نسبتی مشخص با استفاده از حد واسط EDC متصل شدند. به منظور تأیید باند ایجاد شده بین گروه آمین کیتوزان و کربوکسیل استتاریک اسید و کاپریک اسید طیف های حاصل از دستگاه FT-IR استفاده شد. در (شکل ۴-۱) طیف های FT-IR مربوط به کیتوزان، استتاریک اسید، کاپریک اسید، نانوژل های کیتوزان- استتاریک اسید و کیتوزان کاپریک اسید نشان داده شده است.





شکل ۴-۱: طیف های FT-IR مربوط به الف: کیتوزان، ب: استتاریک اسید، ج: کاپریک اسید، د: نانوذله کیتوزان- استتاریک اسید و: نانوذله کیتوزان-کاپریک اسید.

در شکل (۴-۱-الف) طیف کیتوزان جذب در ناحیه  $3500-3400 \text{ cm}^{-1}$  را نشان می دهد که این مربوط به گروه هیدروکسیل کیتوزان می باشد. در  $2873 \text{ cm}^{-1}$  پیک مربوط به ارتعاش کششی گروه های  $\text{CH}_2$  است. در  $2137$  و  $1653 \text{ cm}^{-1}$  به ترتیب پیک ها مربوط به ارتعاشات کششی گروه های  $\text{N-H}$  و  $\text{N-C}$

آمید کیتوزان ( گروه های آمین دی استیله نشده) مشاهده می شود. پیک در  $1454 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاشات C-H موجود در حلقه های قند است (Chiono et al., 2010).

در شکل (۴-۱-ب) طیف مربوط به استتاریک اسید نشان داده شده است. پیک های شناسایی شده در  $2918 \text{ cm}^{-1}$  و  $2849 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاش کششی C-H گروه های  $\text{CH}_2$ . پیک  $1703 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاش کششی  $\text{C}=\text{O}$  گروه کربوکسیل اسید چرب،  $1467 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاش خمشی C-H گروه های  $\text{CH}_2$  و گروه  $\text{CH}_3$  اسید چرب،  $936 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاش خمشی O-H اسید کربوکسیلیک، و پیک  $687 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاش خمشی C-H است.

در شکل (۴-۱-ج) طیف مربوط به کاپریک اسید نشان داده شده است. پیک های شناسایی شده در  $2925$  و  $2854 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاش کششی C-H گروه های  $\text{CH}_2$ . پیک  $1710 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاش کششی  $\text{C}=\text{O}$  گروه کربوکسیل اسید چرب،  $1465 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاش خمشی C-H گروه های  $\text{CH}_2$  و گروه  $\text{CH}_3$  اسید چرب،  $933 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاش خمشی O-H اسید کربوکسیلیک، و پیک های  $722$  و  $682 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاش خمشی C-H است (Larkin, 2011).

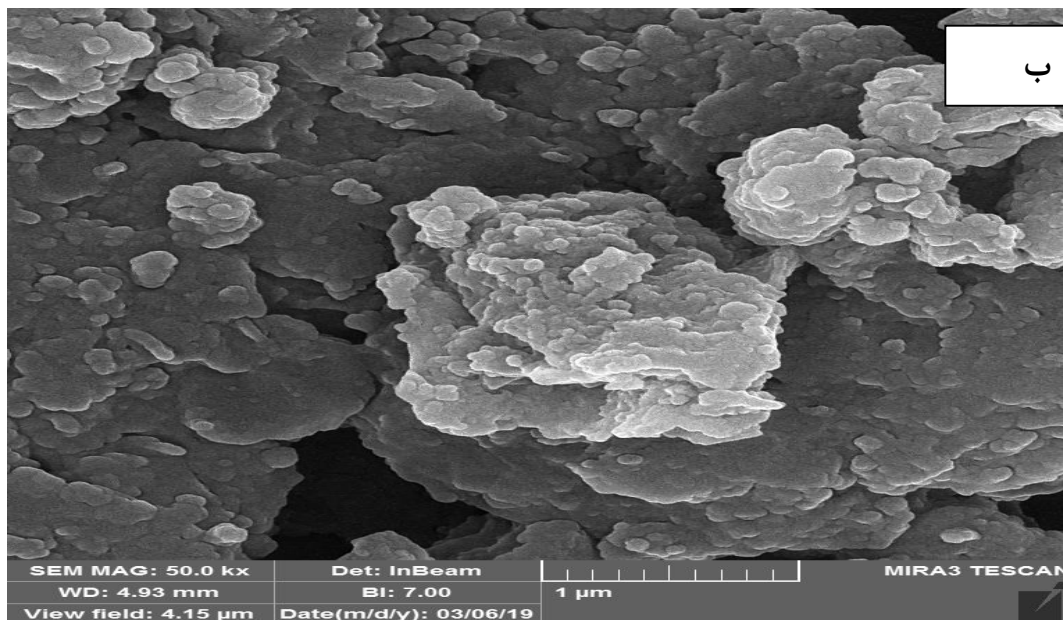
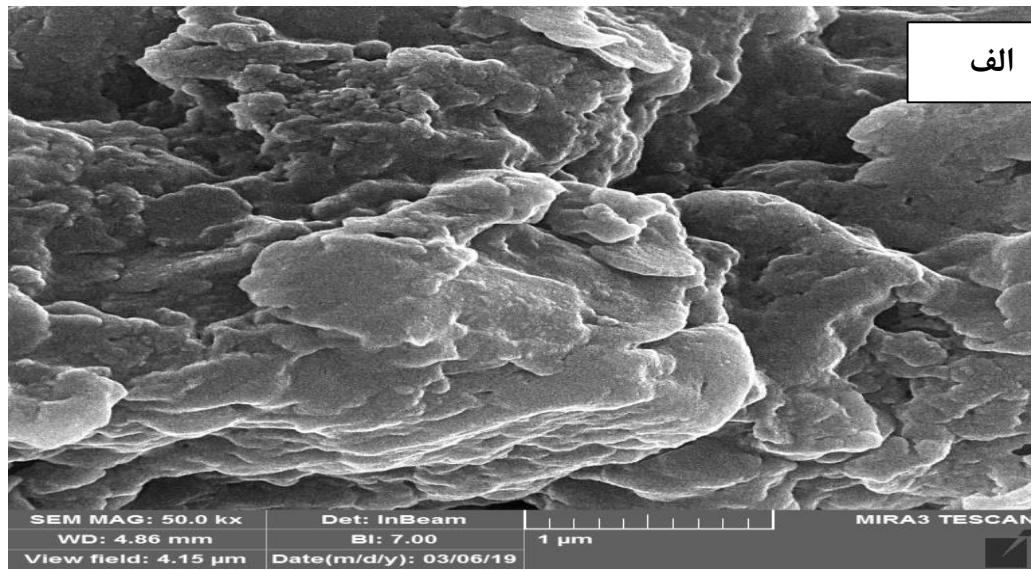
در شکل (۴-۱-د) طیف مربوط به نانوزل کیتوزان-استتاریک اسید نشان داده شده است. با توجه به شکل (۴-۱-د) پیک های مشاهده شده در نواحی  $2065$ ،  $1709$ ،  $1631$  و  $1529$  به ترتیب مربوط به پیوندهای N-C،  $\text{C}=\text{O}$  و N-H گروه آمید هستند. این نتایج نشان می دهد که اتصالات آمیدی بین کیتوزان و استتاریک اسید به خوبی شکل گرفته است.

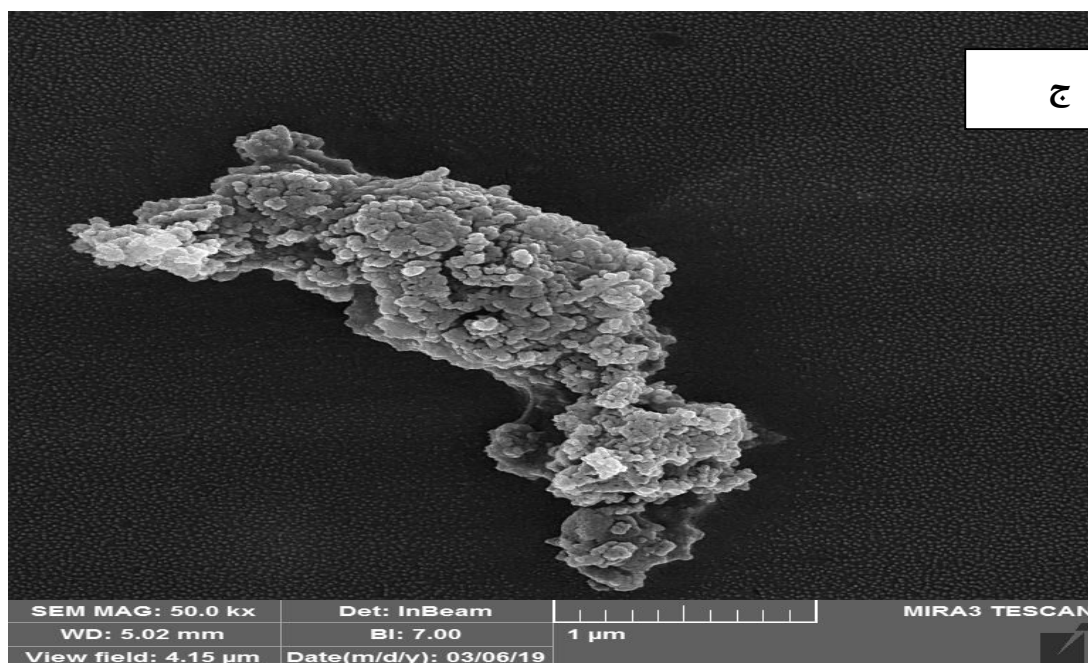
در شکل (۴-۱-و) طیف مربوط به نانوزل کیتوزان-کاپریک اسید نشان داده شده است. با توجه به شکل (۴-۱-ج) پیک های مشاهده شده در نواحی  $2066$ ،  $1708$ ،  $1631$  و  $1532$  به ترتیب مربوط به پیوندهای N-C،  $\text{C}=\text{O}$  و N-H گروه آمید هستند. این نتایج نشان می دهد که اتصالات آمیدی بین کیتوزان و کاپریک اسید به خوبی شکل گرفته است.

## ۲-۲-۴ بررسی ساختار نانوذله ها توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی FE-

(SEM)

در شکل (۲-۴) تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی مربوط به کیتوزان اصلاح نشده، نانوذله های کیتوزان-استئاریک اسید و کیتوزان-کاپریک اسید نشان داده شده است.





شکل ۴-۲: عکس میکروسکوپ الکترونی روبشی کیتوزان (الف)، نانوذله کیتوزان-کاپریک اسید (ب) و نانوذله کیتوزان-استتاریک اسید (ج)

با توجه به شکل ۴-۲ می توان مشاهده کرد که کیتوزان به صورت یک توده می باشد و ذرات نانو به خوبی شکل نگرفته است. اما در مورد نانوذله کیتوزان-کاپریک اسید و نانوذله کیتوزان-استتاریک اسید ذرات کروی در محدوده نانو ایجاد شده است. در حقیقت با اضافه شدن استتاریک اسید و کاپریک اسید به زنجیر های کیتوزان تشکیل ذرات بهتر شده است. همچنین با توجه به شکل ( ۲-۴ ) می توان بیان کرد که در مورد نانوذله کیتوزان-استتاریک اسید در مقایسه با نانوذله کیتوزان-کاپریک اسید ذرات بهتر تشکیل شده است. تشکیل بهتر نانوذرات در مورد نانوذله کیتوزان-استتاریک اسید و کاپریک اسید را می توان به افزایش خاصیت آبگریزی کاپریک اسید و استتاریک اسید مربوط دانست که این افزایش خاصیت آبگریزی احتمالاً توانسته به تجمع بهتر رشته های کیتوزان و تشکیل نانوذرات کمک کند. این نتایج با نتایج کارهای Atarian و همکاران (۲۰۱۹)، عبداللهی (۱۳۹۶)، حسینی (۱۳۹۶) و شهبازی (۱۳۹۶) مطابقت دارد. همچنین تشکیل بهتر ذرات در مورد نانوذله کیتوزان-استتاریک اسید در مقایسه

با نانوذله کیتوزان-کاپریک اسید را احتمالاً می توان به آبریزتر بودن زنجیره استتاریک اسید به دلیل طویل تر بودن آن در مقایسه با کاپریک اسید مربوط دانست.

عطاریان و همکاران (۲۰۱۸)، در مطالعه ای به بررسی مورفولوژی نانوذله کیتوزان-استتاریک اسید با درصدهای مختلف توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی پرداختند. نتایج نشان داد نانوذله های کیتوزان-استتاریک اسید از نظر یکنواختی اندازه ذرات در نسبت استتاریک اسید به کیتوزان (۱: ۰/۷۵) نتایج مطلوب تری بدست آمد. شکل گیری بهتر نانوذله ها در نسبت های بالاتر استتاریک اسید ممکن است به افزایش هیدروفوبیت زنجیره های کیتوزان منجر شود، که می تواند منجر به انباشت بهتر زنجیره های کیتوزان و تشکیل نانوذله ها شود (Atarian et al., 2019).

بیکي و همکاران (۲۰۱۴)، در مطالعه ای به بررسی مورفولوژی نانوذله کیتوزان-سینامیک اسید با میکروسکوپ الکترونی روبشی پرداختند. نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان داد که نانوذله ها با ساختار کروی و یکنواختی تشکیل شدند و همچنین تعیین کردند اندازه ذرات نانوذله های اندازه گیری شده کمتر از ۱۰۰ نانومتر بود (Beyki et al., 2014).

#### ۳-۴ بررسی پایداری امولسیون پیکرینگ

##### ۳-۴-۱ شاخص خامه ای شدن

پس از آماده سازی نمونه های امولسیون پیکرینگ، نمونه های آماده شده در محیط آزمایشگاه، بدون هیچ جابه جایی به مدت ۷ روز نگهداری شد سپس از نمونه ها پس از ۷ روز عکس دیجیتالی (شکل ۴-۳) تهیه شد.



شکل ۴-۳: عکس دیجیتالی نمونه های امولسیون پیکرینگ کیتوزان، نانوزل کیتوزان-کاپریک اسید و کیتوزان-استئاریک اسید پس از ۷ روز نگهداری در دمای اتاق.

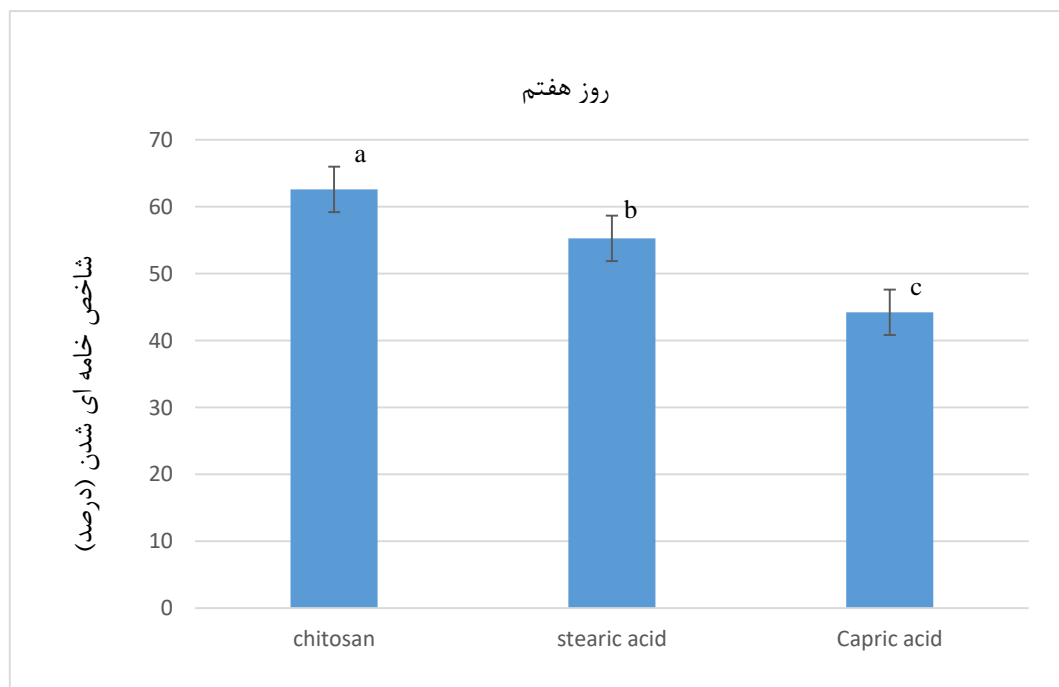
(شکل ۴-۳) نشان دهنده تصویر ظاهری نمونه های امولسیون پیکرینگ بعد از ۷ روز نگهداری می باشد. تصویر ظاهری دو فاز شدن یا خامه ای شدن را نشان می دهد که این خامه ای شدن با اندکی تفاوت در همه نمونه ها وجود دارد. به طوری که این دو فاز شدن در نمونه کیتوزان بیشتر از نمونه های دیگر بود و در نمونه ی کیتوزان-استئاریک اسید با اندکی تفاوت بیشتر از کیتوزان-کاپریک اسید بود که به صورت ظاهری دیده شد.

شاخص خامه ای شدن با استفاده از اندازه گیری ارتفاع لایه سرمی و همچنین ارتفاع کل امولسیون محاسبه شد و مورد مطالعه قرار گرفت. همانطور که در نمودار (شکل ۴-۴) نشان داده شده است، نمونه کیتوزان بیشترین درصد خامه ای شدن و در نمونه کیتوزان-استئاریک اسید نیز درصد خامه ای شدن بیشتر از کیتوزان-کاپریک اسید نشان داد.

تفسیر این پدیده را می توان به این صورت بیان کرد که احتمالاً استئاریک اسید متصل شده به زنجیره های کیتوزان باعث کاهش بیشتر بار مثبت زنجیره های کیتوزان در مقایسه با نانوزل ترکیب شده با کاپریک اسید شده است. بنابراین می توان گفت که نانوزل کیتوزان-استئاریک اسید قطبیت کم و به



دنبال آن نیروی هیدراتاسیون کمتری نسبت به نانوذله کیتوزان-کاپریک اسید داشته که این باعث پایداری بهتر امولسیون پایدار شده با نانوذله کیتوزان-کاپریک اسید شده است (McClements, 2016). مطالعات قبلی نشان داده است که کیتوزان برای تهیه امولسیون O/W مناسب نیست. به عبارت بهتر، از آنجا که کیتوزان یک پلی ساکارید با خواص هیدروفیلی بالا است، برای اصلاح خواص سورفاکتانت آن نیاز به تغییرات سطح دارد (Elsabee et al., 2009). اصلاح کیتوزان از طریق اتصال بین گروه های آمینواسید موجود در کیتوزان و گروه کربوکسیل استئاریک اسید انجام شد. یافته ها نشان داد که اصلاح کیتوزان با استئاریک اسید می تواند عملکرد خود را از نظر افزایش ثبات امولسیون O/W آفتابگردان افزایش دهد. این نتیجه می تواند مربوط به کاهش بار مثبت و افزایش هیدروفوبیت کیتوزان به علت افزایش ارتباطات آمید با افزایش محتوای استئاریک اسید باشد (Atarian et al., 2019).

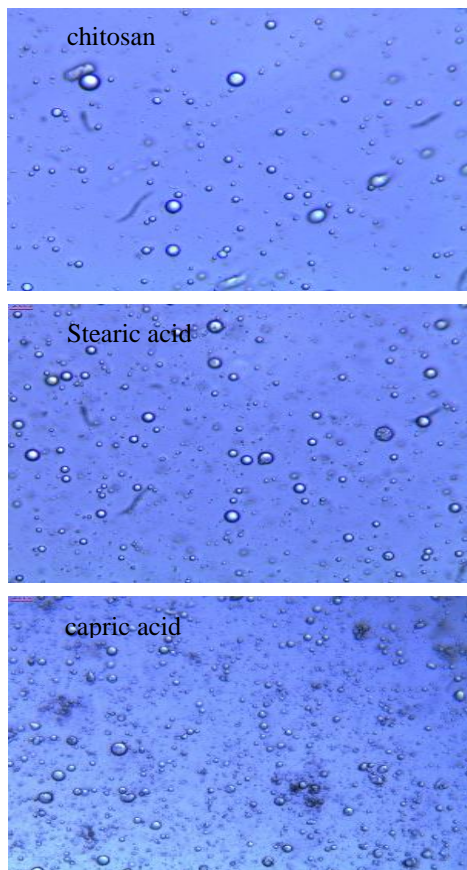


شکل ۴-۴: درصد خامه ای شدن امولسیون پیکرینگ کیتوزان، کیتوزان-استئاریک اسید و کیتوزان-کاپریک اسید بعد از ۷ روز نگهداری در دمای اتاق. حروف لاتین نشان دهنده سطح معنی داری در سطح ۵٪ است.

۴-۳-۲ بررسی پایداری و میانگین اندازه ذرات امولسیون پیکرینگ روغن مورتیرا آلپینا  
پایدار شده با کیتوزان، نانوذله کیتوزان-استتاریک اسید و نانوذله کیتوزان-کاپریک اسید

پس از آماده سازی نمونه های امولسیون پیکرینگ تصاویر میکروسکوپ نوری در همان روز اول آماده سازی پس از ۳ ساعت که در (شکل ۴-۵) آورده شده است.

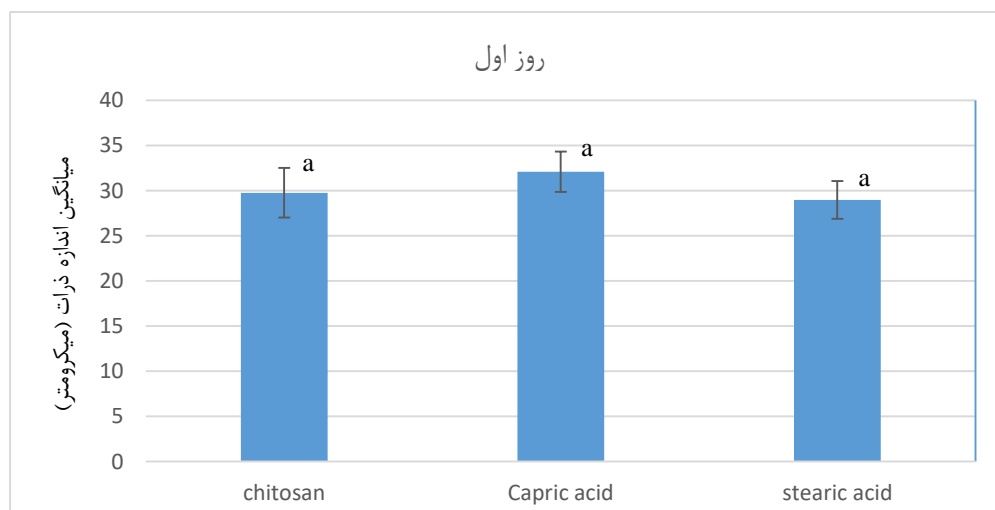
روز اول



شکل ۴-۵: تصاویر میکروسکوپ نوری امولسیون پیکرینگ پایدار شده با کیتوزان، نانوذله کیتوزان-استتاریک اسید و کیتوزان-کاپریک اسید، روز اول

نتایج (شکل ۴-۵) نشان می دهد که در روز اول امولسیون پیکرینگ تهیه شده با نانوذله کیتوزان- استئاریک اسید (بزرگنمایی ۴۰) ریزترین ذرات و امولسیون پیکرینگ تهیه شده با نانوذله کیتوزان- کاپریک اسید (بزرگنمایی ۴۰) درشت ترین ذرات را داشت. هر چند، میان تصاویر نمونه های امولسیون پیکرینگ کیتوزان اصلاح نشده و نانوذله های کیتوزان-استئاریک اسید و کیتوزان-کاپریک اسید اختلاف معنی داری وجود نداشت.

در این پژوهش از امولسیون های پیکرینگ کیتوزان، نانوذله با غلظت مشخص کیتوزان-استئاریک اسید و کیتوزان-کاپریک اسید استفاده شد و تأثیر آن ها را بر روی میانگین اندازه قطرات امولسیون پیکرینگ پس از ۳ ساعت در دمای محیط مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۴-۶).



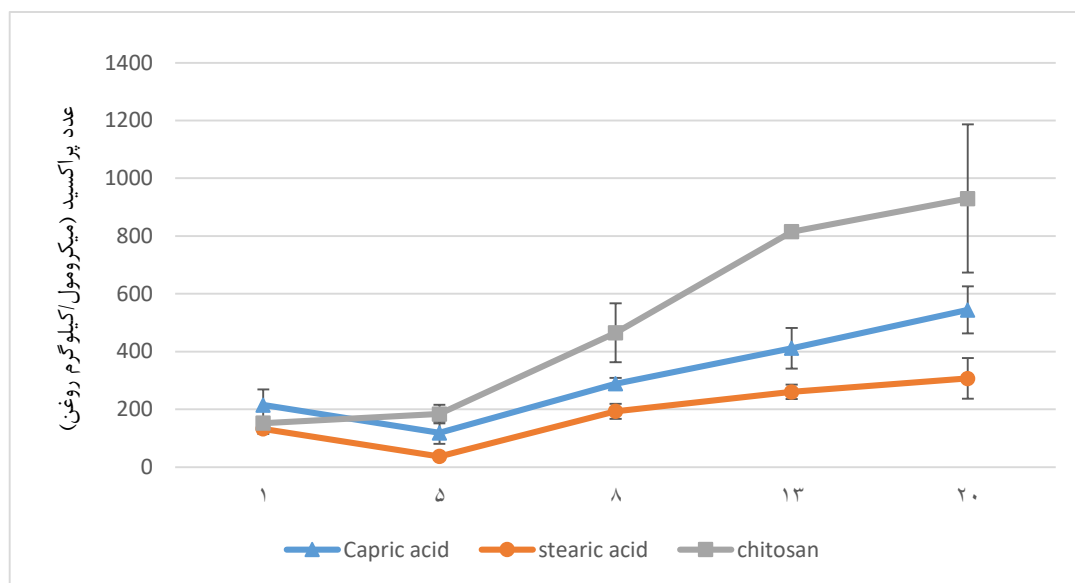
شکل ۴-۶: میانگین اندازه ذرات امولسیون پیکرینگ پایدار شده با کیتوزان، نانوذله کیتوزان-کاپریک اسید و کیتوزان- استئاریک اسید، روز اول. حروف لاتین نشان دهنده سطح معنی داری در سطح ۵٪ است.

برای محاسبه اندازه ذرات به صورت عددی، از تصاویر میکروسکوپی و نرم افزار j imag استفاده شد. اندازه ذرات امولسیون های پیکرینگ در ۳ ساعت (روز اول) بعد از آماده سازی در (شکل ۴-۶) آورده شده است. نتایج (شکل ۴-۶) نشان می دهد که در روز اول امولسیون پیکرینگ تهیه شده با نانوذله

کیتوزان-کاپریک اسید با میانگین اندازه ذرات ۳۲/۰۸ میکرومتر دارای بزرگترین اندازه ذرات و نانوذل کیتوزان-استئاریک اسید با میانگین اندازه ذرات ۲۸/۹۵ میکرومتر دارای کوچکترین اندازه ذرات بودند. اگر چه از نظر آماری اختلاف معنی داری در سطح ۵٪ بین اندازه ذرات کیتوزان اصلاح نشده و نانوذل های کیتوزان-استئاریک اسید و کیتوزان-کاپریک اسید مشاهده نگردید.

#### ۴-۴ اندازه گیری پایداری اکسیداتیو

برای بررسی پایداری اکسیداتیو از سه تیمار مختلف، شامل امولسیون روغن مورتیرا آلپینا و کیتوزان، نانوذل کیتوزان-استئاریک اسید و نانوذل کیتوزان-کاپریک اسید استفاده شد. با توجه به اینکه، پراکسید به عنوان محصول اولیه اکسیداسیون شناخته شده است از اندازه گیری آن برای تعیین محصولات اولیه اکسیداسیون استفاده شد. پراکسیدها همانطور که گفته شد محصولات ابتدایی اکسیداسیون لیپید هستند و نقش مهمی در اتواکسیداسیون لیپیدها ایفا می کنند و در ادامه به کربونیل ها و دیگر ترکیبات ثانویه تجزیه می شوند (Kumari et al., 2014). نتایج آزمون پراکسید برای ارزیابی محصولات اولیه اکسیداسیون تولیدی برای سه تیمار مختلف در روزهای ۱، ۵، ۸، ۱۳ و ۲۰ نگهداری شده در دمای محیط در (شکل ۴-۷) نشان داده شده است.



شکل ۴-۷: نمودار میانگین و انحراف معیار مقادیر پراکسید تیمارهای مختلف در روزهای ۱، ۵، ۸، ۱۳ و ۲۰ نگهداری شده در دمای محیط.

نتایج حاصل نشان می دهد، در روز اول مقدار پراکسید برای هر سه تیمار زیاد می باشد که این زیاد بودن میزان پراکسید در روز اول احتمالاً می تواند به حساس بودن روغن مورتیرلا آلپینا و همچنین اثر فرآیند تشکیل امولسیون مربوط باشد. در طی فرآیند امولسیون از هم زدن شدید و همچنین امواج فراصوت استفاده گردید که هر دو عامل می توانند باعث افزایش اکسیداسیون شوند. از روز اول روند اکسیداسیون در همه نمونه ها یک روند افزایشی بود و در روزهای انتهایی این روند در نمونه امولسیون کیتوزان اصلاح نشده با اختلاف معنی داری بیشتر از امولسیون تهیه شده با نانوذله ها بود و به ۹۲۹/۹۵ میکرومول/کیلوگرم رسید که دارای بیشترین میزان عدد پراکسید نسبت به دو نمونه دیگر بود. نتایج کلی نشان داد، امولسیون پیکرینگ با نانوذله کیتوزان-استتاریک اسید، بیشترین پایداری را داشت، بعد از آن کیتوزان-کاپریک اسید و امولسیون با کیتوزان اصلاح نشده کمترین پایداری با اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد نسبت به دو نمونه دیگر از خود نشان داد. همانطور که قبلاً ذکر شد قطرات روغن درون امولسیون ها به دو روش پوشش سطح قطرات یا افزایش ویسکوزیته محیط می توانند پایدار شوند.

(McClements et al., 2000). با توجه به عکس های میکروسکوپ الکترونی (۲-۴) می توان فهمید که رشته های کیتوزان در حالت اصلاح نشده توانایی کمی در تشکیل ذره داشتند. همچنین به دلیل خاصیت آبدوستی زیاد رشته های کیتوزان (Elsabee et al., 2009)، احتمالاً رشته های کیتوزان تمایل زیادی به اتصال روی سطح روغن نداشتند. به همین دلیل احتمالاً پایداری امولسیون حاوی کیتوزان اصلاح نشده بیشتر مربوط به افزایش ویسکوزیته محیط توسط زنجیره های کیتوزان بوده است و این زنجیره ها کمتر روی سطح قطرات قرار گرفته اند. اما در مورد امولسیون های پایدار شده توسط نانوذل ها به دلیل افزایش خاصیت آبگریزی در نتیجه اصلاح ساختار، پوشش سطح قطرات روغن توسط نانوذل ها بیشتر بوده است. اتصال بیشتر ذرات نانوذل روی سطح قطرات روغن احتمالاً به دلیل ایجاد ممانعت فضایی بین پراکسیدان ها و روغن باعث کاهش روند اکسیداسیون نمونه های امولسیون پایدار شده با نانوذل در مقایسه با نمونه امولسیون پایدار شده با کیتوزان شده است. همچنین پایداری بیشتر نمونه امولسیون پایدار شده با نانوذل کیتوزان-اسید نسبت به امولسیون پایدار شده با نانوذل کیتوزان-کاپریک اسید احتمالاً به خاصیت هیدروفوبی بیشتر نانوذل کیتوزان-اسید در مقایسه با نانوذل کیتوزان-کاپریک اسید مربوط باشد که این خاصیت هیدروفوبی بیشتر باعث پوشش بهتر سطح قطرات روغن و در نتیجه اثر ممانعت کنندگی بیشتر شده است.

در مطالعه ای تاثیر ذرات سلولز میکروکریستال (MCC) و نشاسته اصلاح شده (MS) بر روی پایداری اکسیداتیو مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد ساختار و ویژگی های فیزیکی ذرات تأثیر زیادی بر خواص امولسیون های پیکرینگ دارند. شار ذرات، اندازه و غلظت نقش مهمی در تأثیر میزان اکسیداسیون چربی دارند. ذرات MCC به طور قابل توجهی میزان اکسیداسیون چربی را نسبت به ذرات MS کاهش می دهد. این به طور بالقوه می تواند به دلیل توانایی آن ها در از بین بردن رادیکال های آزاد از طریق شار منفی و همچنین توانایی آن ها در تشکیل یک لایه ضخیم در اطراف قطرات روغن باشد. در نتیجه، استفاده از ذرات برای تثبیت امولسیون یک رویکرد مؤثر است نه تنها باعث افزایش

پایداری فیزیکی امولسیون های روغن در آب می شود، همچنین به طور قابل توجهی ثبات اکسیداتیو را افزایش می دهد (Kargar et al., 2012).

ویژگی های فیزیکی امولسیون ها مانند اندازه قطره، فاز روغنی، نوع امولسیفایر و غلظت، عوامل مهمی در کنترل پایداری اکسیداسیون چربی می باشند. علاوه بر این، کاهش کسری فاز روغنی از ۳۰٪ تا ۵٪، تولید هیدروپراکسید و تولید ترکیبات ثانویه را به دلیل افزایش پراکسیدان ها در هر سطح را افزایش می دهد. ساختار امولسیفایر نقش مهمی در ثبات اکسیداسیون چربی دارد، سدیم کازئینات (CAS) دارای توانایی خوبی برای کاهش میزان اکسیداسیون در مقایسه با Tween 20 به علت توانایی آن برای ایجاد یک لایه ضخیم در اطراف قطرات روغن است. ما برای اولین بار نشان داده ایم که ذرات در سطح (ذرات پیکرینگ) قادر به کاهش میزان اکسیداسیون چربی هستند. به این معنی است که یا به علت ضخامت لایه اطراف قطرات تفکیک شده است و بنابراین یون های فلزی را از سطح قطرات جدا می کند و یا به دلیل سطح تماس سطحی بین روغن و فاز آبی است (Kargar et al., 2011).

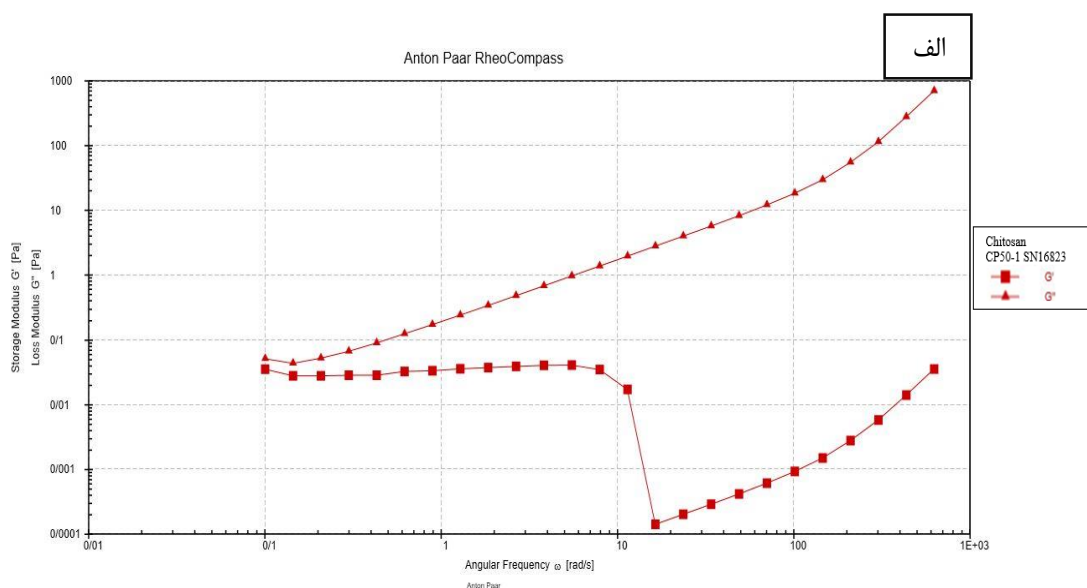
علاوه بر این، کیتوزان یکی از اجزای مهم در امولسیون O/W چند لایه است که برای تثبیت امولسیون ها و محافظت از مواد تشکیل دهنده لیپوفیلیک از اکسیداسیون استفاده می شود و بار مثبت کیتوزان برای ایجاد ساختار چند لایه از طریق جذب الکترواستاتیک بین لایه ها ضروری است. با این حال، نیاز به تشکیل سیستم O/W چند لایه می باشد که امولسیون های اولیه باید بار منفی را حمل کنند، که استفاده از امولسیون های غیر یونی را محدود می کند. بنابراین با تغییر ساختار کیتوزان با استفاده از استتاریک اسید به منظور تغییر فعالیت سطحی کیتوزان یا فعالیت سطحی به همراه فعالیت آنتی اکسیدانی آن انجام شد. این عمل نه تنها آنتی اکسیدان های محلول در آب را به سطح روغن و آب می رساند، بلکه باعث کاهش میزان استفاده از آن می شود، زیرا باعث افزایش کارایی آنتی اکسیدان ها می شود و بدون از بین بردن آنتی اکسیدان های غیر واکنشی در فاز آبی می شود (Yang et al., 2017). در مطالعه ای که توسط (عطاریان و همکاران) انجام شد مشاهده کردند که پایداری اکسیداتیو مطلوب

ترین امولسیون پیکرینگ و تثبیت امولسیون توئین ۸۰ با استفاده از آزمون های پراکسید و اسید ثوباربتوریک مورد ارزیابی قرار گرفت. یافته ها نشان داد که امولسیون O/W با تثبیت توسط نانوذلهای کیتوزان-استتاریک اسید دارای پایداری اکسایش بیشتری نسبت به امولسیون O/W که با توئین ۸۰ تثبیت شده است. این تفاوت ممکن است احتمالاً به بار مثبت قطرات امولسیون پوشیده شده با نانوذلهای کیتوزان-استتاریک اسید مربوط باشد لازم به ذکر است که در نانوذلهای کیتوزان-استتاریک اسید که در فرمول امولسیون پیکرینگ استفاده می شوند، تمام گروه های آمین کیتوزان به گروه های کربوکسیلیک اسید، استتاریک اسید وابسته نیستند و برخی از گروه های آمین آزاد بودند، مربوط شود (Atarian et al., 2019).

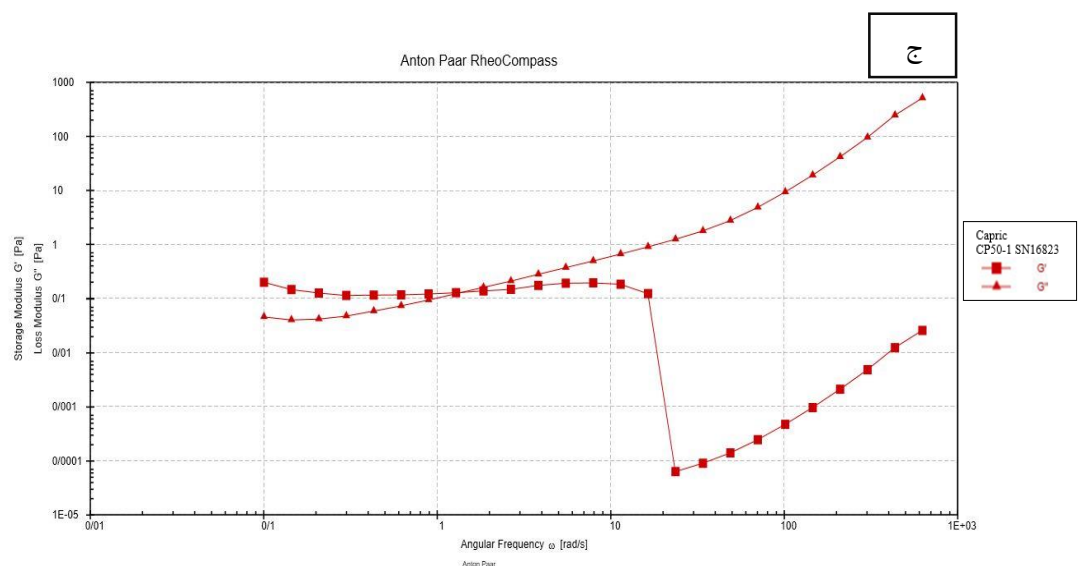
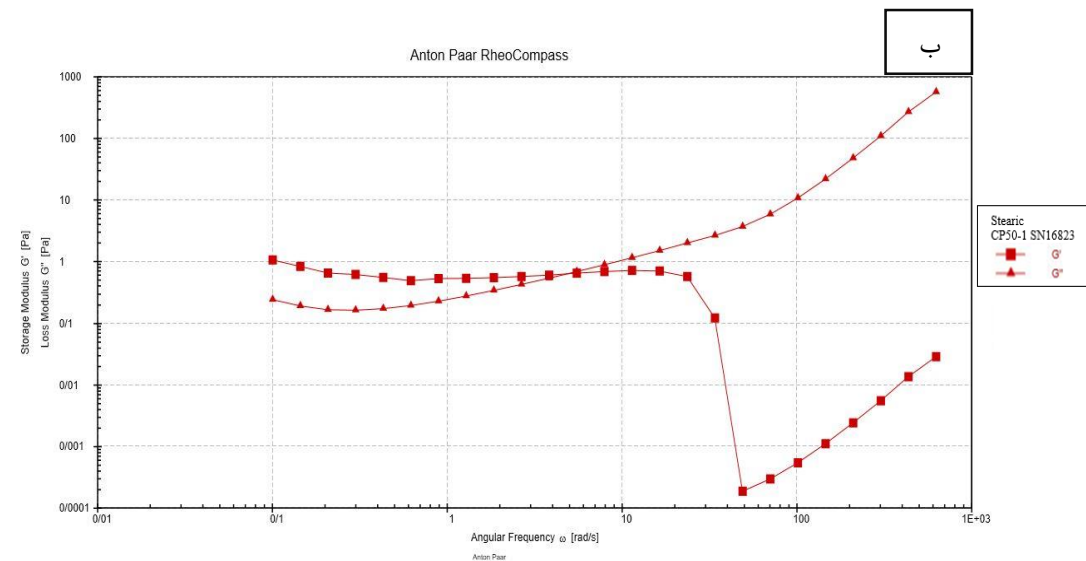
#### ۴-۵ آزمون رئولوژی نمونه های کیتوزان، نانوذلهای کیتوزان-استتاریک اسید و کیتوزان-

##### کاپریک اسید

آزمون نوسانی برای ارزیابی رفتار ویسکو الاستیک نمونه امولسیون های مختلف انجام شد. نتایج حاصل از آزمون نوسانی در (شکل ۴-۸) نشان داده شده است.







شکل ۴-۸: تست رئولوژی ( $G'$  و  $G''$ )، الف: کیتوزان، ب: کیتوزان-استئاریک اسید ج: کیتوزان-کاپریک اسید

نتایج نشان داد که در نمونه امولسیون پیکرینگ با کیتوزان اصلاح نشده در فرکانس های اعمال شده، رفتار ویسکوز بر رفتار الاستیک غالب بود. این نشان می دهد که امولسیون تهیه شده با کیتوزان در غلظت ۲۰ درصد روغن حالت مایع مانند داشته است. در مورد نمونه امولسیون تهیه شده با نانوزل کیتوزان-استئاریک اسید از فرکانس ۰/۱ تا حدود ۶ رفتار الاستیک بیشتر از رفتار ویسکوز بود اما در فرکانس های بالاتر از ۶ رفتار ویسکوز غالبتر از رفتار الاستیک بود. در مورد نمونه امولسیون تهیه شده

با نانوذله کیتوزان-کاپریک اسید از فرکانس ۰/۱ تا ۱ رفتار الاستیک بر رفتار ویسکوز غالب بود و همانند نمونه امولسیون تهیه شده با نانوذله کیتوزان-استتاریک اسید در فرکانس های بالاتر رفتار ویسکوز غالب بود. این نتیجه نشان می دهد که امولسیون های تهیه شده با نانوذله در فرکانس های پایین حالت جامد مانند و در فرکانس های بالا حالت مایع مانند را دارند. همچنین در مورد امولسیون های تهیه شده با نانوذله ما وابستگی به فرکانس را مشاهده می کنیم که این وابستگی به فرکانس نشان می دهد که در ساختار امولسیون شبکه زلی تشکیل شده است و این شبکه زلی دارای برهمکنش های فیزیکی غیر کووالانسی ضعیف هستند. این نتیجه با نتایج کار محققین دیگر مطابقت دارد. از جمله مطالعه انجام شده بر روی امولسیون پیکرینگ تثبیت شده با نانوذرات نشاسته نامحلول (ISNP) و نانو ذرات نشاسته محلول در اکتینیل (OSA-SSNP)، نتایج نشان داد  $G'$  همواره بیش از  $G''$  است که وابستگی هر دو مدول به کل دامنه فرکانس می باشد، که حضور یک ساختار زله مانند در سیستم امولسیون O/W را نشان می دهد که این وابستگی فرکانس یک رفتار معمول زله ضعیف است (Ye et al., 2017). مطالعه انجام شده توسط (دائی و همکاران) بر روی خواص رئولوژیکی زله امولسیون پیکرینگ نشان داد که برای تمام زله های امولسیون پیکرینگ،  $G'$  بیشتر از  $G''$  در محدوده فرکانس از ۰/۱ تا ۱۰۰ راد در ثانیه بود، که ساختار زله مانند الاستیک زله امولسیون پیکرینگ را نشان می دهد همچنین افزایش مقدار روغن (۰/۵ - ۰/۷) منجر به افزایش تدریجی مقادیر  $G'$  و  $G''$  شد. با افزایش حجم روغن تراکم نسبی قطرات زله امولسیون افزایش می یابد و منجر به افزایش  $G'$  در یک کسر روغن بالاتر می شود تغییر  $G'$  به طور عمده به فرکانس منعکس شده مربوط می باشد که نشان می دهد ساختار زله مانند زله امولسیون پیکرینگ عمدتاً به دلیل تعاملات فیزیکی غیر کوانتومی است (Dai et al., 2017).

همچنین با توجه به شکل ۴-۸ ب و ۴-۸ ج می توان مشاهده کرد که رفتار الاستیک نمونه امولسیون تهیه شده با نانوذله کیتوزان-استتاریک اسید اندکی بیشتر از امولسیون تهیه شده با نانوذله کیتوزان-کاپریک اسید بوده است. این نتیجه نشان می دهد که شبکه زلی تشکیل شده در امولسیون با نانوذله

کیتوزان-استئاریک اسید اندکی قویتر از امولسیون آماده شده با نانوذله کیتوزان-کاپریک اسید بوده است. با توجه به تفاوت استئاریک اسید با کاپریک اسید از نظر طول زنجیره هیدروکربنی می توان بیان کرد که اصلاح ساختار کیتوزان به عنوان پایدار کننده امولسیون با اسیدهای بلند زنجیرتر می تواند منجر به امولسیون های با خاصیت ژل گونه بیشتر منجر شود.

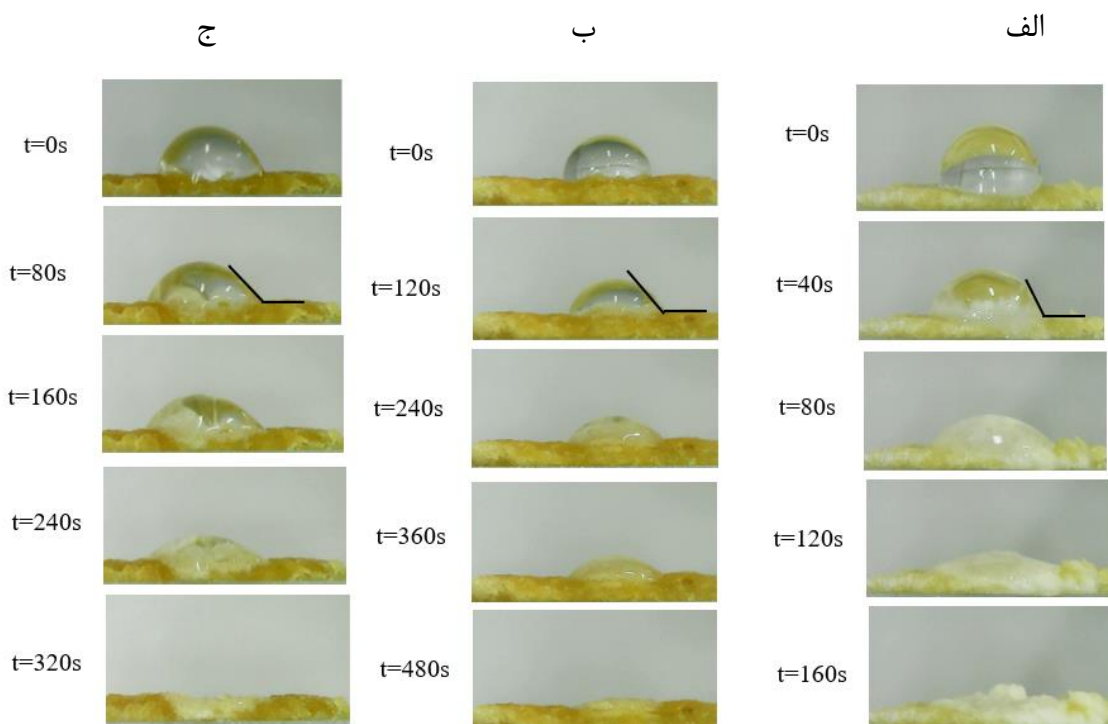
در مطالعه ای که بر روی خمیر زیتون در طول استخراج روغن صورت گرفت، نتایج نشان داد وابستگی فرکانس  $G'$  و  $G''$  به وسیله زمان مالاکسینگ تحت تأثیر قرار نمی گیرد. برای همه نمونه های خمیر زیتون  $G'$  و  $G''$  با افزایش فرکانس افزایش پیدا کردند،  $G'$  بزرگتر از  $G''$  بود اما کمتر از یک Log بود، که نشان می دهد خمیر زیتون یک رفتار رئولوژیکی شبه جامد دارد که در دیگر خمیر میوه ها و سبزی ها مثل خمیر آوکادو، گوجه و پوره سیب زمینی دیده می شود. مقادیر  $G'$  و  $G''$  خمیر زیتون با افزایش زمان مالاکسینگ کاهش پیدا کرد، این نتایج ممکن است با افزایش در دسترس بودن بخش مایع در طول زمان مالاکسینگ مربوط به تجمع قطره های روغن در ترکیب خمیر زیتون باشد. هنگامی که قطرات روغن به اندازه کافی کوچک باشند باعث ایجاد یک نمودار نسبتاً منظم می شوند، اگر مقدار قطرات روغن بیش از حد بزرگ باشد دیگر آن ها از سیستم پشتیبانی نمی کنند و شروع به تداخل با ساختار خمیر می کنند، که اندازه بزرگتر قطرات در محلول، مقادیر پایین تر  $G'$  را برای امولسیون آب در روغن و روغن در آب نشان می دهد. این نتایج همچنین با یافته های مارتینز پادایلا و همکاران (۲۰۱۷) موافق است (Yang et al., 2019).

در مطالعه ای دیگر تأثیر نوع روغن و کیفیت حلال بر رفتار رئولوژیکی ژل امولسیون تثبیت شده روغن در گلیسرول را مورد بررسی قرار دادند در همه موارد ژل امولسیون  $G'$  بیشتر از  $G''$  است که این نشان می دهد در هر غلظت پروتئینی و محتوای روغنی قدرت ژل و کشش متقاطع با افزایش قطبیت روغن افزایش پیدا می کند که نشان دهنده شکل گیری ساختار ژل قوی تر و پایدارتر در برابر شکست ساختاری است. این نتایج مرتبط به این حقیقت است که قطبیت بالاتر روغن تعاملات هیدروفوبی بین

روغن و پروتئین را کاهش می دهد بنابراین افزایش تعاملات بین پروتئین باعث شکل گیری یک شبکه قوی تر در فاز پیوسته می شود. علاوه بر این افزایش آب در فاز پیوسته قدرت ژل را افزایش می دهد و در برابر شکست ساختار مقاومت می کند، برای بیشتر روغن های غیر قطبی مقاومت ژل و مقاومت در برابر شکست بیشتر بود ولی روغن های غیر قطبی نتایج مخالف این را داشتند (Zou et al., 2019).

#### ۴-۶ اندازه گیری انحلال پذیری امولسیون پودری

برای بررسی میزان انحلال پذیری ذرات با روش اندازه گیری زاویه تماس از نمونه امولسیون های (کیتوزان، نانوذله کیتوزان-استئاریک اسید و کیتوزان-کاپریک اسید) پودر شده به روش خشک کن انجمادی استفاده شد. زاویه تماس یک پارامتر برای بررسی میزان آبدوستی و همچنین سرعت جذب آب می باشد. در مورد نمونه های مختلف پس از قرار گرفتن قطره آب بر روی سطح پودر، تغییر زاویه تماس به عنوان تابع زمان ثبت شد. لازم به ذکر است که هر نمونه پنج بار تکرار شد.



شکل ۴-۹: میزان انحلال پذیری نمونه های امولسیون پودری کیتوزان(الف)، کیتوزان-اسید استئاریک(ب) و کیتوزان-کاپریک اسید(ج)

نتایج اندازه گیری زاویه تماس نشان داد که نمونه حاوی کیتوزان اصلاح نشده کمترین زاویه تماس را داشت و جذب آب سریعتر از بقیه نمونه ها بود. نمونه امولسیون پودر شده کیتوزان-استتاریک اسید بیشترین زاویه تماس و کمترین جذب آب نسبت به نمونه های دیگر داشت. نمونه امولسیون پودر شده کیتوزان-کاپریک اسید ما بین نمونه کیتوزان و کیتوزان-استتاریک اسید بود. این نتیجه احتمالاً مربوط به زنجیره های آبگریز متصل شده به ساختار کیتوزان می باشد. همانگونه که نتایج نشان داد با افزایش زنجیره هیدروکربنی (استتاریک اسید) زاویه تماس بیشتر شده است. این نتایج نشان می دهد که خاصیت هیدروفوبی ذرات نانوذله کیتوزان-استتاریک اسید از نانوذله کیتوزان-کاپریک اسید بیشتر بوده است. با توجه به اینکه خاصیت هیدروفیلی کیتوزان زیاد می باشد (Elsabee, Morsi, and AlSabagh, 2009)، افزایش خاصیت هیدروفوبی کیتوزان بوسیله زنجیره های غیر قطبی همانند استتاریک اسید می تواند خاصیت امولسیفایری آن را افزایش دهد. اما از طرف دیگر در مورد انحلال پذیری مجدد امولسیون های پودر شده اصلاح ساختار می تواند یک عامل منفی محسوب شود.

در مطالعه ای چند پودر آگلومره و استاندارد شامل کازئین میسلار (MC)، پروتئین شیر ایزوله شده (MPI) و پروتئین آب پنیر ایزوله شده (WPI) را از نظر زاویه تماس و جذب قطره آب مورد مقایسه قرار دادند نتایج نشان داد که، پودر های آگلومره معمولاً نسبت به پودرهای معمولی زودتر آب جذب می کنند زیرا قطره به راحتی می تواند بین ذرات پودر نفوذ کند و آن را سریعتر خیس کند (Ji et al., 2016).

## نتیجه گیری

نتایج پروفایل اسید چرب روغن مورتیرا آلپینا نشان داد که اسید چرب غالب در این روغن آراشیدونیک اسید بود. نتایج طیف FT-IR اتصال موفقیت آمیزی بین کیتوزان، استئاریک اسید و کاپریک اسید را نشان داد. نتایج حاصل از بررسی ساختار کیتوزان اصلاح نشده، نانوذلهای کیتوزان-استئاریک اسید و کیتوزان-کاپریک اسید توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان داد که کیتوزان اصلاح نشده نتوانست نانوذرات یکنواخت تشکیل دهد و با اضافه شدن استئاریک اسید و کاپریک اسید به زنجیرهای کیتوزان باعث ایجاد نانوذرات یکنواخت تر شد که این را می توان به افزایش خاصیت آبگریزی کاپریک اسید و استئاریک اسید مربوط دانست که این افزایش خاصیت آبگریزی احتمالاً توانسته به تجمع بهتر رشته های کیتوزان و تشکیل نانوذرات کمک کند. نتایج حاصل از بررسی پایداری امولسیون های پیکرینگ نشان داد اختلاف معنی داری در سطح ۵٪ بین کیتوزان، نانوذلهای کیتوزان-استئاریک اسید و کیتوزان-کاپریک اسید از نظر اندازه ذرات مشاهده نشد. با دستیابی به فرمولاسیون مناسب برای آماده سازی امولسیون پیکرینگ، پایداری اکسیداتیو آن مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که امولسیون های پایدار شده توسط نانوذلهای کیتوزان به دلیل افزایش خاصیت آبگریزی در نتیجه اصلاح ساختار کیتوزان باعث پوشش بهتر سطح قطرات روغن شده است که این منجر به افزایش پایداری اکسیداتیو شده است. نتایج آزمون رئولوژی نشان داد که در نمونه امولسیون پایدار شده با کیتوزان رفتار ویسکوز بر رفتار الاستیک غالب بود. اما در مورد نمونه های امولسیون پایدار شده با نانوذلهای فرکانس های پایین رفتار الاستیک بیشتر از رفتار ویسکوز بود. وابستگی به فرکانس مشاهده شد در نمونه های امولسیون پایدار شده با نانوذلهای کیتوزان-استئاریک اسید و کیتوزان-کاپریک اسید مشاهده شد و این شبکه زلی دارای برهمکنش های فیزیکی غیر کووالانسی ضعیف بوده است. نتایج اندازه گیری زاویه تماس نشان داد که نمونه پودر شده حاوی کیتوزان کمترین زاویه تماس و جذب آب سریعتر و نمونه امولسیون پودر شده حاوی کیتوزان-استئاریک اسید بیشترین زاویه تماس و کمترین جذب آب را داشته است.

## پیشنهادات

- پژوهش هایی در زمینه تهیه کیتوزان هایی با قدرت های متفاوت امولسیفایری برای امولسیون های مختلف از طریق تغییر در نسبت های کیتوزان بکار رفته، طراحی شود.
- اثر نانوژل های کیتوزان اصلاح شده با ترکیبات دیگر نیز مورد بررسی و مقایسه با یکدیگر قرار گیرد.
- از نانوذرات دیگر برای پایداری امولسیون پیکرینگ روغن مورتیرلا آلپینا استفاده شود.
- درون پوشانی سایر روغن های میکروبی غنی از اسیدهای چرب غیر اشباع بلند زنجیره بررسی شود.

## منابع

حسینی، ا. س. (۱۳۹۶). پایان نامه کارشناسی ارشد صنایع غذایی، تولید امولسیون روغن بذر کتان با استفاده از نانوذله حاوی اسانس میخک (*Dianthus Caryophyllus*) و بررسی پایداری اکسیداتیو آن، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود.

حسینی، س.، آذین، م.، قوامی، م. و حسینی-مظفری، س. ض. (۱۳۹۱). بررسی تولید روغن میکروبی به وسیله *Mortierella alpina* علوم غذایی و تغذیه، سال نهم، شماره ۳، ص ۱۴-۵

شهبازی، ن. (۱۳۹۶). پایان نامه کارشناسی ارشد صنایع غذایی، تولید امولسیون روغن هسته انار پایدار شده با نانوذله حاوی اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) و ارزیابی اکسیداتیو آن، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود.

صمدلویی، ح.، عزیزی، م. ح. و برزگر برویی، م. (۱۳۸۶). اثر آنتی اکسیدانی ترکیبات فنولیک هسته انار بر روغن سویا. علوم کشاورزی و منابع طبیعی، شماره ۴، دوره ۴: ص ۱۹۳-۲۰۰

عبداللهی، س. م. (۱۳۹۶). پایان نامه کارشناسی ارشد صنایع غذایی، تولید و ارزیابی اکسیداتیو امولسیون روغن سیاهدانه پایدار شده با نانوذله حاوی اسانس رزماری، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود.

قبادی، ز. (۱۳۸۸). بهینه سازی تولید آراشیدونیک اسید توسط قارچ مورتیرلا آلپینا CBS 754.68 در تخمیر حالت جامد.

پایان نامه کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، ص ۱۰۰

**Affandi, M. M. M., Tripathy, M., and Majeed, A. B. A. (2017).** Solubility enhancement of simvastatin and atorvastatin by arginine: contact angle determination, wettability and surface energy characteristics. *Journal of Molecular Liquids*, 240, 340-344.

**Agulló, E., Rodríguez, M. S., Ramos, V., and Albertengo, L. (2003).** Present and future role of chitin and chitosan in food. *Macromolecular Bioscience*, 3(10), 521-530.

**Aiba, S., Humphrey, A. E., and Millis, N. F. (1973).** *Biochemical Engineering*. 2nd ed., University of Tokyo Press, Japan.

**Atarian, M., Rajaei, A., Tabatabaei, M., Mohsenifar, A., & Bodaghi, H. (2019).** Formulation of Pickering sunflower oil-in-water emulsion stabilized by chitosan-stearic acid nanogel and studying its oxidative stability. *Carbohydrate polymers*, 210, 47-55.

**Benatti, P., Peluso, G., Nicolai, R. and Calvani, M. (2004).** Polyunsaturated fatty acid: biochemical, nutritional and epigenetic properties. *Journal of the American College of Nutrition*, 23, 281-302.

**Beopoulos, A., Sescut, J., Haddouche, R., Uribe Larra, J., Molina-jouve, C., Nicaud, J. (2009).** *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Progress in Lipid Research*, 483, 375-387.



**Berton-Carabin, C. C., Ropers, M. H. and Genot, C. (2014).** Lipid Oxidation in Oil-in-water Emulsions: Involvement of the Interfacial Layer, *J. of .Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(5), 945-977.

**Beyki, M., Zhavah, S., Khalili, S.T., Rahmani-Cherati, T., Abollahi, A., Bayat, M., Tabatabaei, M. and Mohsenifar, A. (2014).** Encapsulation of Mentha piperita essential oils in chitosan-cinnamic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. *J.of . Industrial Crops and Products*, 54, 310-319

**Binks, B. P., Muijlwijk, K., Koman, H., & Poortinga, A.T. (2017).** Food-grade Pickering stabilisation of foams by in situ hydrophobisation of calcium carbonate particles. *Food Hydrocolloids* 63, 585–592.

**Carlson, S. E., Werkman, S. H., Peeples, J. M., Cooke, R. J. and Tolley, E. A. (1993).** Arachidonic acid status correlates with first year growth in preterm infants. *Proceeding of National Academic Science of USA*, 90, 1073-1077.

**Cauvin, S., Colver, P. J. and Bon, S. A. (2008).** Pickering stabilized miniemulsion polymerization: preparation of clay armored latexes. *J. of . Macromolecules*, 38(19), 7887-7889.

**Certik, M., and Shimizu, S. (1999).** Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 87, 1-4.

**Certík, M., Sláviková, L., Masrnová, S., and Sajbidor, J. (2006).** Enhancement of Nutritional Value of Cereals with-Linolenic Acid by Fungal Solid-State Fermentations. *Food Technol. Biotechnol*, 44 (1) 75-82.

**Chacko, R. T., Ventura, J., Zhuang, J., and Thayumanavan, S. (2012).** Polymer nanogels: a versatile nanoscopic drug delivery platform. *Advanced drug delivery reviews*, 64(9), 836-851.

**Chen, X. G., Lee, C. M., and Park, H. J. (2003).** O/W emulsification for the self-aggregation and nanoparticle formation of linoleic acid modified chitosan in the aqueous system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(10), 3135-3139.

**Cheong, A. M., Tan, K. W., Tan, C. P. and Nyam, K. L. (2016).** Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) Seed oil-in-water Pickering nanoemulsions stabilized by mixture of sodium caseinate, Tween 20 and  $\beta$ -cyclodextrin. *J. of .Food Hydrocolloids*, 52, 934-941.

**Cheung, R.C.F., Ng, T.B., Wong, J.H., and Chan, W.Y. (2015).** Chitosan: An update on potential biomedical and pharmaceutical applications.

**Chevalier, Y., and Bolzinger, M. A. (2013).** Emulsions stabilized with solid nanoparticles: Pickering emulsions. *J. of .Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 439, 23-34.

**Chiono, V., Gentile, P., Boccafoschi, F., Carmagnola, I., Ninov, M., Georgieva, V., Georgiev, G., and Ciardelli, G. (2010).** Photoactive Chitosan Switching on Bone-Like Apatite Deposition. *Biomacromolecules*, 11, 309–315

- Choe, E., and Min, D. B. (2006).** Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety Mechanisms and Factors for Edible Oil Oxidation. *J. of .Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5, 169-186.
- Cortés-Triviño, E., Valencia, C., Delgado, M. A., and Franco, J. M. (2018).** Rheology of epoxidized cellulose pulp gel-like dispersions in castor oil. Influence of epoxidation degree and the epoxide chemical structure. *Carbohydrate polymers*, 199, 563-571.
- Dai, L., Sun, C., Wei, Y., Mao, L., Gao, Y. (2017).** Characterization of Pickering emulsion gels stabilized by zein/gum arabic complex colloidal nanoparticles. *Food Hydrocolloids*
- Damasceno, E. T. S., Almeida, R. R., de Carvalho, S. Y. B., de Carvalho, G. S. G., Mano, V., Pereira, A. C., & de Lima Guimarães, L. G. (2018).** Lippia organoides Kunth. essential oil loaded in nanogel based on the chitosan and  $p$ -coumaric acid: Encapsulation efficiency and antioxidant activity. *Industrial Crops and Products*, 125, 85-94.
- De Vos, P., Faas, M.M., Spasojevic, M. and Sikkema, J., (2010).** Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, 20(4), 292-302.
- Delmas, T., Piraux, H., Couffin, A. C., Texier, I., Vinet, F., Poulin, P., & Bibette, J. (2011).** How to prepare and stabilize very small nanoemulsions. *Langmuir*, 27(5), 1683-1692.
- Desai, K.G.H. and Jin Park, H., (2005).** Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying technology*, 23(7), 1361-1394.
- Diaz-Salmeron, R., Chaab, I., Carn, F., Djabourov, M. and Bouchemal, K. (2016).** Pickering emulsions with  $\alpha$ -cyclodextrin inclusions: Structure and thermal stability. *J. of .Colloid and Interface Science*, 482, 48-57.
- Dong, M., and Walker, T. (2008a).** Addition of polyunsaturated fatty acids to canola oil by fungal conversion. *Enzyme and Microbial Technology*, 42, 514–520.
- Dong, M., and Walker, T. (2008b).** Production and recovery of polyunsaturated fatty acids-added lipids from fermented canola. *Bioresource Technology*, 99, 8504–8506.
- Dridi, W., Essafi, W., Gargouri, M., Leal-Calderon, F., and Cansell, M. (2016).** Influence of formulation on the oxidative stability of water-in-oil emulsions. *Food chemistry*, 202, 205-211.
- Dyal, S. D., and Narine, S. S. (2005).** Implications for the use of *Mortierella* fungi in the industrial production of essential fatty acid. *Food Research International*, 38, 445–467.
- Eghbal, N., and Choudhary, R. (2018).** Complex coacervation: Encapsulation and controlled release of active agents in food systems. *LWT - Food Science and Technology*, 90, 254-264.
- Elsabee, M.Z., Morsi, R.E., and Al-Sabagh, A.M. (2009).** Surface active properties of chitosan and its derivatives. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 74(1), 1–16.

- Esquerdo, V. M., Dotto, G. L., and Pinto, L. A. A. (2015).** Preparation of nanoemulsions containing unsaturated fatty acid concentrate-chitosan capsules. *Journal of colloid and interface science*, 445, 137-142.
- Farokhzad, O. C., and Langer, R. (2009).** Impact of nanotechnology on drug delivery. *ACS Nano*, 3, 16-20.
- Fathi, M., and Mohebbi, M. (2010).** Increasing food safety using nanotechnology. *Magazine of Nanotechnology Initiative Council*, 143, 16-18.
- Feng, J., Wu, S., Wang, H., & Liu, S. (2016).** Improved bioavailability of curcumin in ovalbumin-dextran nanogels prepared by Maillard reaction. *Journal of Functional Foods* 27, 55–68.
- Finco, A. M. O., Mamani, L. D. G., Carvalho, J. C., Pereira, G. V. M., Thomaz-Soccol, V. and Soccol, C. R. (2016).** Technological trends and market perspectives for production of microbial oils rich in omega-3. *Biotechnology*, 37, 656-671.
- Folsch, J., Lees, M. and Sloane-Stanely, G. H. (1957).** A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226, 497-509.
- Freitas, A. C., Pereira, L., Rodrigues, D., Carvalho, A. P., Panteleitchouk, T., Gomes, A. M., & Duarte, A. C. (2015).** Marine Functional Foods. In *Hb25\_Springer Handbook of Marine Biotechnology* (pp. 969-994). Springer Berlin Heidelberg.
- Frelichowska, J., Bolzinger, M. A. and Chevalier, Y. (2010).** Effects of solid particle content on properties of o/w Pickering emulsions. *J. of Colloid and Interface Science*, 351(2), 348-356.
- Fujikawa, S., Higashiyama, K. and Shimizu, S. (1999).** *Bioscience and Bioindustry*, 57, 818–821.
- Ghosh, A., Mandal, A. K., Sarkar, S., Panda, S. & Das, N. (2009).** Nanoencapsulation of quercetin enhances its dietary efficacy in combating arsenic-induced oxidative damage in liver and brain of rats. *Life Sciences*, 84, 75-80.
- Gill, I., and Valivety, R. (1997).** Polyunsaturated fatty acid, part 1: occurrence, biological activities and applications. *Trends in Biotechnology*, 15, 401-409.
- Gutiérrez, J. M., González, C., Maestro, A., Sole, I., Pey, C. M., & Nolla, J. (2008).** Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 13(4), 245-251.
- Hamid, A. A., Aiyelaagbe, O. O., Usman, L. A., Ameen, O. M. and Lawal, A. (2010).** Antioxidants: Its medicinal and pharmacological applications. *African J. of Pure and Applied Chemistry*, 4(8), 142-151.
- Hayes, W. A., and Nair, N. G. (1978).** The cultivation of *Agaricus bisporus* and other edible fungi. In: Smith JE, Berry DR, editors. *The Filamentous Fungi*, 1, 55–63.
- Higashiyama, K., Fujikawa, S., Park, E. Y. and Shimizu, S. (2002).** Production of arachidonic acid by *Mortierella* fungi. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 7, 252-262.

- Higashiyama, K., Yaguchi, T., Akimoto, K., Fujikawa, S. and Shimizu, S. (1998).** Enhancement of arachidonic acid production by *Mortierella alpina* 1S-4. Journal of American Oil Chemist's Society, 75, 1501-1505.
- Huang, C., Chen, X. F., Xiong, L., Ma, L. L., & Chen, Y. (2013).** Single cell oil production from low-cost substrates: the possibility and potential of its industrialization. Biotechnology advances, 31(2), 129-139.
- Hwang, B., Kim, J., Park, C., Park, C., Kim, Y., Ryu, Y. (2005).** High level production of arachidonic acid by fed-batch culture of *Mortierella alpina* using NH<sub>4</sub>OH as a nitrogen source and pH control. Biotechnology Letters, 27, 731-735.
- Inanc, T., and Maskan, M. (2012).** The Potential Application of Plant Essential Oils/Extracts as Natural Preservatives in Oils during Processing: A Review. J. of Food Science and Engineering, 2, 1-9.
- Jang, H. D., Lin, Y. Y. and Yang, S. S. (2000).** Polyunsaturated fatty acid production with *Mortierella alpina* by solid substrate fermentation. Botanical Bulletin of Academia Sinica, 41, 41-48.
- Jang, H. D., Lin, Y. Y. and Yang, S. S. (2005).** Effect of culture media and conditions on polyunsaturated fatty acids production by *Mortierella alpina*. Bioresource Technology, 96, 1633-1644.
- Ji, J., Fitzpatrick, J., Cronin, K., Maguire, P., Zhang, H., and Miao, S. (2016).** Rehydration behaviours of high protein dairy powders: The influence of agglomeration on wettability, dispersibility and solubility. Food Hydrocolloids, 58, 194-203
- Ji, X-J., Zhang, A-H., Nie, Z-K., Wu, W-J., Ren, L-J., Huang, H. (2014).** Efficient arachidonic acid-rich oil production by *Mortierella alpina* through a repeated fed-batch fermentation strategy. Bioresource Technology, 170, 356-360.
- Jin, M., Huang, H., Xiao, A., Zhang, K., Liu, X., Li, S., and Peng, C. (2008).** A novel two-step fermentation process for improved arachidonic acid production by *Mortierella alpina*. Biotechnology Letters, 30, 1087-1091.
- Kargar b, M., Spyropoulos, F., and Norton, I. T. (2011).** The effect of interfacial microstructure on the lipid oxidation stability of oil-in-water emulsions. Journal of colloid and interface science, 357(2), 527-533.
- Kargar, M., Fayazmanesh, K., Alavi, M., Spyropoulos, F. and 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. J. of Colloid and Interface Science, 366(1), 209-215.
- Kargar, M., Spyropoulos, F., & Norton, I. T. (2011).** The effect of interfacial microstructure on the lipid oxidation stability of oil-in-water emulsions. Journal of Colloid and Interface Science, 357(2), 527-533
- Katouzian, I., and Jafari, S.M. (2016).** Nano-encapsulation as a promising approach for targeted delivery and controlled release of vitamins. Trends in Food Science & Technology, 53, 34-48.

**Kavadia, A., Komaitis, M., Chevalot, I., Blanchard, F., Marc, I. and Aggelis, G. (2001).** Lipid and gamma-linolenic acid accumulation in strains of Zygomycetes growing on glucose. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 78, 341–346.

**Kawashima, H., Akimoto, K., Higashiyami, K., Fujikawa, S. and Shimizu, S. (2000).** Industrial production of dihomo-gammalinolenic acid by a delta5-desaturase-defective mutant of *Mortierella alpina* 1S-4 fungus. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 77, 1135–1138.

**Khalili, S. T., Mohsenifar, A., Beyki, M., Zhavah, S., Rahmani-Cherati, T., Abdollahi, A., and Tabatabaei, M. (2015).** Encapsulation of Thyme essential oils in chitosan-benzoic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. *LWL-Food Science and Technology*. 60(1), 502-508.

**Kikukawa, H., Sakuradani, E., Ando, A., Shimizu, S., and Ogawa, J. (2018).** Arachidonic acid production by the oleaginous fungus *Mortierella alpina* 1S-4: A review. *Journal of Advanced Research*, 11, 15-22.

**Kim, H. (1997).** Lipid production in fungi. PhD. Thesis. Auburn University, Alabama, USA.

**Klinkesorn, U. (2013).** The role of chitosan in emulsion formation and stabilization. *Food Reviews International*, 29(4), 371-393.

**Koike, Y., Cai, H., Higashiyama, K., Fujikawa, S., Park, E. (2001).** Effect of consumed carbon to nitrogen ratio on mycelial morphology and arachidonic acid production in cultures of *Mortierella alpina*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91, 382–389.

**Kokal, S. (2005).** Crude Oil Emulsions: A State-Of-The-Art Review. *J. of .SPE Production and Facilities*, 20(1), 5-13.

**Kuipers, J. (2009).** Mean-Field description of the structure and tension of curved fluid interfaces. Faculty of Science, Leiden University, p, 93.

**Kumari, J. A., Venkateshwarlu, G., Choukse, M. K. and Anandan, R. (2015).** Effect of essential oil and aqueous extract of ginger (*Zingiber Officinale*) on oxidative stability of fish oil-in-water emulsion. *J. of .Food Processing and Technology*, 6, 1, p 1.

**Kyle, D. (1996).** Arachidonic acid and methods for the production and use thereof. PCT Patent WO96/21037.

**Lan, W. Z., Qin, W. M. and Yu, L. J. (2002).** Effect of glutamate on arachidonic acid production from *Mortierella alpina*. *Letters in Applied Microbiology*, 35, 357-360.

**Larkin, P. (2011).** Infrared and Raman spectroscopy: principles and spectral interpretation . Elsevier.

**Li, X. M., Xie, Q. T., Zhu, J., Pan, Y., Meng, R., Zhang, B., ... and Jin, Z. Y. (2019).** Chitosan hydrochloride/carboxymethyl starch complex nanogels as novel Pickering stabilizers. Physical stability and rheological properties. *Food Hydrocolloids*, 93, 215-225.

- Li, X., and Xia, W. (2011).** Effects of concentration, degree of deacetylation and molecular weight on emulsifying properties of chitosan. *International journal of biological macromolecules*, 48(5), 768-772.
- Li, X., Lin, Y., Chang, M., Jin, Q., Wang, X. (2015).** Efficient production of arachidonic acid by *Mortierella alpina* through integrating fed-batch culture with a two-stage pH control strategy. *Bioresource Technology*, 181, 275-282.
- Li, X., Liu, R., Li, j., Chang, M., Liu, Y., Jin, Q., and Wang, X. (2015).** Enhanced arachidonic acid production from *Mortierella alpina* combining atmospheric and room temperature plasma (ARTP) and diethyl sulfate treatment. *Bioresource Technology*, 177, 134-140.
- Lindberg, A. M., and Molin, G. (1993).** Effect of temperature and glucose supply on the production of polyunsaturated fatty acids by fungus *Mortierella alpina* CBS 343.66 in fermentor cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 39, 450-455.
- Liu, Z., Jiao, Y., Wang, Y., Zhou, C., and Zhang, Z. (2008).** Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Advanced drug delivery reviews*, 60(15), 1650-1662.
- Lopez rubio, A., Gavara, R. & Lagaron, J. M. (2006).** Bioactive packaging: turning foods into healthier foods through biomaterials. *Trends in Food Science and Technology*, 17, 567-575.
- Martínez-Padilla, L. P., Franke, L., and Juliano, P. (2017).** Characterisation of the viscoelastic properties of avocado puree for process design applications. *Biosystems engineering*, 161, 62-69.
- McClements D. J. (2007).** Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability. *J. of Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(7), 61-649.
- McClements, D. J. (2016).** *Food Emulsions*. Edition 3rd Edition. Imprint CRC Press, 70-84.
- McClements, D., and Decker, E. (2000).** Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions: Impact of Molecular Environment on Chemical Reactions in Heterogeneous Food Systems. *Journal of Food Science* 65(8), 1270–1282.
- Mei, L., Decker, E. A., and McClements, D. J. (1998).** Evidence of iron association with emulsion droplets and its impact on lipid oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(12), 5072-5077.
- Metcalf, L. C., Schmitz, A. A. and Pelka, J. R. (1996).** Rapid preparation of methyl esters from lipid for gas chromatography analysis. *Analytical Chemistry*, 38, 514-518.
- Muller, R., Petersen, R., Hommos, A. & Pardeike, J. (2007).** Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 522-530.
- Murphy, D. (1991).** Storage lipid bodies in plants and other organisms. *Progress in Lipid Research*, 29, 299-324.

- Mwangi, W.W., Ho, K.W., Tey, B.T., & Chan, E.S. (2016).** Effects of environmental factors on the physical stability of pickering-emulsions stabilized by chitosan particles. *Food Hydrocolloids* 60, 543–550.
- Nanjawade, B. K., Manvim F. V,M and Manjappa, A. S. (2007).** Retracted: In situ-forming hydrogels for sustained ophthalmic drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 122(2), 119-134.
- Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S. and Bugarski, B. (2011).** An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*, 1, 1806-1815.
- Nisha, A., and Venkateswaran G. (2008).** Effect of Culture Variables on Mycelial Arachidonic acid Production by *Mortierella alpina*. *Food Bioprocess Technology*, 18, 111–120.
- Oehlke, K., Adamiuk, M., Behnlian, D., Gräf, V., Mayer-Miebach, E., Walz, E. and Greiner, R. (2014).** Potential bioavailability enhancement of bioactive compounds using foodgrade engineered nanomaterials: a review of the existing evidence. *Food & function*, 5(7), 1341-1359.
- Owens, C., Griffin, K., Khouryieh, H. and Williams, k. (2018).** Creaming and oxidative stability of fish oil-in-water emulsions stabilized by whey protein-xanthan-locust bean complexes: Impact of pH. *Food Chemistry*, 239, 314-322.
- Park, E. Y., Koike, Y., Higashiyama, K., Fujikawa, S. and Okabe, M. (1999).** Effect of nitrogen source on mycelia morphology and arachidonic acid production in cultures of *Mortierella alpina*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 88, 61-67.
- Raemdonck, K., Demeester, J., and De Smedt, S. (2009).** Advanced nanogel engineering for drug delivery. *Sofi Matter*, 5(4), 707-715.
- Ratledge, C. (1993).** Single cell oils-have they a biotechnological future? *Trends in Biotechnology*, 11, 278-284.
- Ratledge, C. (2004).** Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochemie*, 86, 807-815.
- Ratledge, C. (2005).** Single cell oils for 21st century. In: Cohen, Z. and Ratledge, C. (eds.). *Single Cell Oil*. American Oil Chemist's Society Press, Champaign, IL, USA.
- Rodriguez, M. S., Albertengo, L. A., and Agullo, E. (2002).** Emulsification capacity of chitosan. *Carbohydrate polymers*, 48(3), 271-276.
- Rosa, S., Soria, M., Velez, C., Galvagno, M. (2010).** Improvement of a two-stage fermentation process for docosahexaenoic acid production by *Aurantiochytrium limacinum* SR21 applying statistical experimental designs and data analysis. *Bioresource Technology*, 101, 2367–2374.
- Rousseau, D. (2000).** Fat crystals and emulsion stability. A review, *J. of Food Research International*, 33 (1), 3-14.

- Sabouni, R., and Gomaa, H. G. (2015).** Effect of hydrodynamics on nanoparticles stability in Pickering emulsions stabilized by metal organic frameworks (MOFs) in reversing shear flow. *J. of Colloids and Surfaces A; Physicochemical and Engineering Aspects*, 484, 416-423.
- Sagalowicz, L., and Leser, M. E. (2010).** Delivery systems for liquid food products. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15, 61-72.
- Sakamoto, T., Sakuradani, E., Okuda, T., Kikukawa, H., Ando, A., Kishino, S., Izumi, Y., Bamba, T., Shima, J and Ogawa, J. (2017).** Metabolic engineering of oleaginous fungus *Mortierella alpina* for high production of oleic and linoleic acids. *Bioresource Technology*, 1610-1615.
- Sakuradani, E., Hirano, Y., Kamada, N., Nojiri, M., Ogawa, J., Shimizu, S. (2004).** Improvement of arachidonic acid production by mutants with lower n-3 desaturation activity derived from *Mortierella alpina*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66, 243–248.
- Samadlouie, H. R., Hamidi-Esfahani, Z., Alavi, S. M., and Varastegani, B. (2014).** Expression analysis for genes involved in arachidonic acid biosynthesis in *Mortierella alpina* CBS 754.68. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(2), 439-445.
- Samadlouie, H. R., Nurmohamadi, S., Moradpoor, F., and Gharanjik, S. (2018).** Effect of low-cost substrate on the fatty acid profiles of *Mortierella alpina* CBS 754.68 and *Wickerhamomyces siamensis* SAKSG. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 1-8.
- Schmidt, W. F., Barone, J. R., Francis, B., & Reeves III, J. B. (2006).** Stearic acid solubility and cubic phase volume. *Chemistry and physics of lipids*, 142(1-2), 23-32.
- Schuster, D. (Ed.). (1996).** Encyclopedia of emulsion technology (Vol. 4). CRC Press.
- Shah, P., Bhalodia, D., and Shelat, P. (2010).** Nanoemulsion: A pharmaceutical review. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 1 (1), 24.
- Shantha, N. C., and Deeker, E. A. (1994).** Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. *J. of AOAC International*, 77(2), 421-424.
- Sharma, A., Garg, T., Aman, A., Panchal, K., Sharma, R., Kumar, S., & Markandeywar, T. (2016).** Nanogel—an advanced drug delivery tool: Current and future. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 44(1), 165-177.
- Sheikhshoaei, F., Abbasi, S., & Sahari, M. (2013).** Effects of various factors on the oxidative stability of  $\omega$ -3 fatty acid-enriched Doogh *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, 7, 1-10.
- Shimizu, S., Kawashima, H., Akimoto, K., Shinmen, Y., Yamada, H. (1988).** Production of eicosapentaenoic acid by *Mortierella* fungi. *Journal of American Oil Chemists Society*, 66,342–347.
- Shin, G.H., Kim, J.T. and Park, H.J. (2015).** Recent developments in nanoformulations of lipophilic functional foods. *Trends in Food Science & Technology*, 46(1), 144-157.



**Shinmen, Y., Shimizu, S., Akimoto, K., Kawashima, H. and Yamada, H. (1989).** Production of arachidonic acid by *Mortierella* fungi: selection of a potent producer and optimization of culture conditions for large-scale production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 31, 11-16.

**Silvestre, M. P. C., Chaayasit, W., Brannan, R. G., McClements, D. J., and Decker, E. A. (2000).** Ability of surfactant headgroup size to alter lipid and antioxidant oxidation in oil-in-water emulsions. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(6), 2057-2061.

**Singh, A., and Ward, O. P. (1997)** Production of high yields of arachidonic acid in a fed-batch system by *Mortierella alpina* ATCC 32222. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48, 1-5.

**Stredanska, S., and Sajbidor, J. (1993).** Influence of carbon and nitrogen sources on the lipid accumulation and arachidonic acid production by *Mortierella alpina*. *Acta Biotechnology*, 13, 185-191.

**Streekstra, H. (1997).** On the safety of *Mortierella alpina* for the production of food ingredients, such as arachidonic acid. *Journal of Biotechnology* 56, 153–165

**Sultana, F., Arafat, M., & Sharmin, S. (2013).** An Overview of Nanogel Drug Delivery System. 3, 95–105.

**Sun, Y. E., Wang, W. D., Chen, H. W., and Li, C. (2011).** Autoxidation of unsaturated lipids in food emulsion. *Critical reviews in food science and nutrition*, 51(5), 453-466.

**Tamjidi, F., Shahedi, M., Varshosaz, J. and Nasirpour, A. (2013).** Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 19, 29-43.

**Totani, N., Hyodo, K. and Ueda, T. (2000b).** Minerals essential for growth of the filamentous fungus, *Mortierella alpina*. *Journal of Japanese Oil Chemist's Society*, 49, 487-493.

**Wang, L. J., Hu, Y. Q., Yin, S. W., Yang, X. Q., Lai, F. R., & Wang, S. Q. (2015).** Fabrication and characterization of antioxidant pickering emulsions stabilized by zein/chitosan complex particles (ZCPs). *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(9), 2514-2524.

**Wang, M., Chen, H., Ailati, A., Chen, W., Chilton, F. H., Lowther, W. T., and Chen, Y. Q. (2017).** Substrate specificity and membrane topologies of the iron-containing  $\omega 3$  and  $\omega 6$  desaturases from *Mortierella alpina*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 102(1), 211-223.

**Waraho, T., McClements, D. J. and Decker, E. A. (2011).** Impact of free fatty acid concentration and structure on lipid oxidation in oil-in-water emulsions. *J. of Food Chemistry*, 129(3), 854-859.

**Ward, O. P., and Singh, A. (2005).** Omega-3/6 fatty acid: alternative sources of production. *Process Biochemistry*, 40, 3627-3652.

- Weiss, J., Decker, E.A., McClements, D.J., Kristbergsson, K., Helgason, T. and Awad, T. (2008).** Solid lipid nanoparticles as delivery systems for bioactive food components. *Food Biophysics*, 3(2), 146-154.
- Wynn, J. P., and Ratledge, C. (2000).** Evidence that the rate-limiting step for the biosynthesis of arachidonic acid in *Mortierella alpina* is at the level of the 18:3 to 20:3 elongase. *Microbiology*, 146, 2325–2331.
- Yang, H., Zhang, H., Peng, J., Zhang, Y., Du, G. and Fang, Y. (2017).** Smart magnetic ionic liquid-based Pickering emulsions stabilized by amphiphilic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles: Highly efficient extraction systems for water purification. *J. of Colloid and Interface Science*, 485(620), 213-222.
- Yang, S., Hallett, I., Oh, H. E., Woolf, A. B., & Wong, M. (2019).** Application of electrical impedance spectroscopy and rheology to monitor changes in olive (*Olea europaea* L.) pulp during cold-pressed oil extraction. *Journal of Food Engineering*, 245, 96-103.
- Ye, F., Miao, M., Jiang, B., Campanella, O. H., Jin, Z., & Zhang, T. (2017).** Elucidation of stabilizing oil-in-water Pickering emulsion with different modified maize starch-based nanoparticles. *Food chemistry*, 229, 152-158.
- Zambrano-Zaragoza, M. L., and Quintanar-Guerrero, D. (2018).** Novel Techniques for Extrusion, Agglomeration, Encapsulation, Gelation, and Coating of Foods. *Food Science*, 1, 379-392.
- Zhang, M., Wang, A. J., Li, J. M., Song, Y. and He, R. (2017).** Factors influencing the stability and type of hydroxyapatite stabilized Pickering emulsion. *J. of Materials Science and Engineering: C*, 70, 396-404.
- Zhaveh, S., Mohsenifar, A., Beiki, M., Khalili, S. T., Abdollahi, A., Rahmani-Cherati, T., & Tabatabaei, M. (2015).** Encapsulation of Cuminum cyminum essential oils in chitosan-caffeic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. *Industrial Crops and Products*, 69, 251-256.
- Zhu, M., Yu, L. J., and Wu, Y. X. (2003).** An inexpensive medium for production of arachidonic acid by *Mortierella alpina*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 30, 75-79.
- Zhu, M., Zhou, P. P. and Yu, L. J. (2002).** Extraction of lipid from *Mortierella alpina* and enrichment of arachidonic acid from the fungal lipids. *Bioresource Technology*, 84, 93-95.
- Zou, Y., Thijssen, P-P., Yang, X. and Scholten, E. (2019).** The effect of oil type and solvent quality on the rheological behavior of zein stabilized oil-in-glycerol emulsion gels. *Food Hydrocolloids*, 91, 57-65.

## Abstract

The purpose of this study was to encapsulate *mortierella alpina* lipid using chitosan nanogel, and to investigate the effect of the coating on the oxidative stability of *mortierella alpina* lipid. The results of the gas chromatography test showed that about 42% of the *mortierella alpina* lipid was composed of arachidonic acid that has 20-carbon fatty acid with 4 unsaturated bonds. The results of the FT-IR spectrum confirmed the connection between chitosan and capric acid as well as stearic acid. The results of scanning electron microscopic photos showed that with the addition of stearic acid and capric acid, chitosan chains appropriately formed nanoparticles, and improved the formation of chitosan-stearic acid nanoparticles compared to chitosan-capric acid. The effect of each variable factors like chitosan, stearic acid and capric acid on the size of oil droplets and the stability of Pickering emulsion *mortierella alpina* lipid was investigated in three hours and seven days after production. The results showed that there was not significant difference in the level of 5% between chitosan, chitosan-stearic acid and chitosan-capric acid nano-gels in terms of particle size. Afterwards, the oxidative stability of the emulsion of *mortierella alpina* lipid during 20 days at ambient temperature was evaluated using peroxide test. The results showed that emulsion produced by chitosan-stearic acid nanogel was the most oxidative stability. The results of rheological tests showed that viscosity behaviors were dominated by elastic behaviors in the impregnating emulsion with unmodified chitosan at the applied frequencies, and the elastic behavior of the emulsion sample prepared with chitosan-stearic acid was slightly higher than the emulsion prepared with chitosan-capric acid nano-gel. The results of contact angle measurement showed that the chitosan-stearic acid powder emulsion had the highest contact angle and had the lowest water absorption than other samples.

**Keywords:** *Mortierella alpina* lipid, Pickering Emulsion, Nanogel Chitosan, Oxidative Stability



Faculty of Agriculture  
M.Sc. Thesis in Food Science

Encapsulation of *Mortierella alpina* lipid and examination of its physicochemical stabilities

By: Marjan Esfandiyari Mehni

Supervisor:

Dr. Hamidreza Samadlouie

Advisor:

Dr. Ahmad Rajaie

June 2019