

نانوکمپلکس کازئینات - پکتین: بررسی طیف‌سنجی فروسرخ، مورفولوژی، ویژگی‌های فیزیکی و رفتار جریان‌ی پایا

ساجده بهرانی^۱ - بابک قنبرزاده^{۲*} - حامد همیشه کار^{۳*} - محمود صوتی خیابانی^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۴/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۲/۲۶

چکیده

یکی از کاربردهای نانو فناوری در زمینه علوم غذایی و دارویی، درون پوشانی (انکپسولاسیون) ترکیبات زیست فعال و تولید سیستم‌های نانوحامل به منظور غنی‌سازی و تولید مواد غذایی فراسودمند می‌باشد. نانوحامل‌ها با استفاده از بیوپلیمرها (پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها) و یا ترکیبات بر پایه لیپید تولید می‌شوند. در این تحقیق، تولید و ویژگی‌های نانوکمپلکس‌های پکتین - کازئین به عنوان یک نانوحامل بالقوه توسط آزمون‌های طیف‌سنجی فرو سرخ (FTIR) و اندازه‌گیری اندازه و توزیع ذرات بررسی شد. نتایج FTIR، ایجاد برهمکنش‌های الکتروستاتیک بین پکتین و کازئین را نشان داد. تصاویر مربوط به میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) و نتایج پتانسیل زتا و اندازه ذرات تشکیل دیسپرسیون پایدار با حداقل اندازه ۸۶ نانومتر را در $\text{pH} = 4/1$ ، کازئین ۱٪ و پکتین ۰/۴۵٪ نشان دادند. محلول‌های نانوکمپلکس در تمامی غلظت‌ها و در آهنگ برشی ثابت، در مقایسه با محلول‌های خالص پکتین و کازئینات سدیم دارای تنش برشی و ویسکوزیته بالاتری بودند و رفتار رئولوژیکی محلول‌های بیوپلیمری از حالت نیوتنی در محلول‌های خالص به سمت رفتار غیرنیوتنی روان شونده با برش (سودوپلاستیک) در برخی نمونه‌های کمپلکس حاوی کازئین و پکتین تغییر کرد.

واژه‌های کلیدی: نانوکمپلکس کازئین - پکتین، طیف سنجی فرو سرخ، پتانسیل زتا، اندازه ذرات، رئولوژی پایا

مقدمه

پروتئین‌های شیر دارای ویژگی‌های عملکردی فراوان هستند و به دو دسته مهم کازئین‌ها و پروتئین‌های آب پنیر تقسیم می‌شوند (Chen *et al.*, 2006). کازئین ۸۰-۷۵ درصد پروتئین شیر را شامل می‌شود که به شکل میسلی در شیر وجود دارد و از چهار بخش اصلی آلفا₁ کازئین، آلفا₂ کازئین، کاپاکازئین و بتاکازئین تشکیل شده است. این میسل‌ها، کلوئیدهایی کروی با اندازه ۵۰-۵۰۰ نانومتر هستند. در صنعت، با افزودن اسیدهای آلی و معدنی به شیر پس‌چرخ، کازئین را رسوب می‌دهند و پس از طی مراحل کازئینات تولید می‌شود. پکتین، هتروپلی‌ساکاریدی آنیونی است که در دیواره سلول گیاهان یافت می‌شود و زنجیر اصلی آن از واحدهای اسید گالاکتورونیک با اتصال $D \alpha$ (۴ به ۱) تشکیل شده و به طور نسبی با متانول استری شده است (Girard *et al.*, 2003).

پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها می‌توانند با ایجاد برهمکنش‌های جذبی^۵، تشکیل کمپلکس‌های محلول یا نامحلول دهند یا در اثر ایجاد

فناوری نانو، کاربرد و استفاده از ذرات و مواد با ابعاد زیر ۱۰۰ نانومتر است و یکی از زمینه‌ها و کاربردهای فناوری نانو، تولید حامل‌هایی با اندازه کمتر از ۱ میکرون به منظور غنی‌سازی مواد غذایی و انتقال ترکیبات فعال (اسیدهای چرب ضروری، آنتی‌اکسیدان‌ها، کاروتنوئیدها و ویتامین‌ها، مواد ضد میکروبی و ...) به بخش‌های هدف می‌باشد (Des Rieux *et al.*, 2006). نانوحامل‌های مورد استفاده در فرآوری مواد غذایی را می‌توان به دو دسته نانوحامل‌های بیوپلیمری و نانوحامل‌های لیپیدی تقسیم کرد. در تولید نانوحامل‌های بیوپلیمری از پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها و یا کمپلکس آن‌ها استفاده می‌گردد.

۱، ۲ و ۴- به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشیار و استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

(*)- نویسنده مسئول: Email: Ghanbarzadeh@tabrizu.ac.ir

(hamishehkar.hamed@gmail.com)

۳- استادیار مرکز تحقیقات دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

پیوندهای یونی، هیدروژنی و الکتروستاتیک است و در محدوده pHهای زیر نقطه ایزوالکتریک بتالاکتوگلوبولین ($PI=5/18$)، با افزودن مقادیر اضافی پکتین با بار منفی، نانوکمپلکس‌های محلول با دافعه الکتروستاتیک قوی‌تری ایجاد می‌شوند. در این تحقیق، بیشترین برهمکنش بین پروتئین و LMP در $pH=4/5$ اتفاق افتاد و نانوکمپلکس‌های با اندازه کمتر از ۱ میکرون تشکیل شدند. Zimet و همکاران (۲۰۰۹) تشکیل نانوکمپلکس‌های بتالاکتوگلوبولین و پکتین کم‌استر حاوی DHA^2 را مورد ارزیابی قرار دادند. نانوکمپلکس‌ها در شرایط اسیدی و در $pH=4/5$ تشکیل شدند و بتالاکتوگلوبولین به عنوان یک نانوحامل طبیعی برای DHA معرفی شد. این نانوکمپلکس‌ها با دارا بودن ذرات با بار منفی، از نظر الکتروستاتیکی پایدار و متوسط اندازه ذرات آن، ۱۰۰ nm گزارش شد. در تحقیق مشابهی Ron و همکاران (۲۰۱۰)، با تشکیل نانوکمپلکس محلول بتالاکتوگلوبولین با پکتین کم‌استر برای انتقال ویتامین D_2 به عنوان ترکیب آگریز مدل، نشان دادند که پلی‌ساکارید LMP، باعث حفاظت ثانویه و پایداری بیشتر ترکیب آگریز محصور در بتالاکتوگلوبولین می‌شود که با نتایج بدست آمده توسط Ye و همکاران (۲۰۰۸) در ارتباط با اثر محافظتی نانوکمپلکس‌های LMP و بتالاکتوگلوبولین از ویتامین D_2 مطابقت داشت.

در این پژوهش ابتدا تشکیل کمپلکس توسط آزمون طیف سنجی فرو سرخ و سپس اثر pH بر پتانسیل زتا و توزیع اندازه ذرات مورد بررسی قرار گرفت. از آنجا که تشکیل کمپلکس در شرایط اسیدی، خواص رئولوژیکی را تحت تأثیر قرار می‌دهد؛ لذا در این تحقیق رفتار رئولوژیکی سیستم مدل حاوی نانوکمپلکس پکتین - کازئین نیز مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد

سدیم کازئینات (۸۸ درصد پروتئین) با ۶ درصد رطوبت از شرکت DMV هلند و پکتین با درجه متوکسیل بالا از شرکت CP Kelco دانمارک خریداری شد. نمک‌های تری پتاسیم سترات، دی پتاسیم هیدروژن فسفات، کلرید کلسیم، اسید کلریدریک و هیدروکسید سدیم از شرکت مواد شیمیایی مرک (Darmstadt, Germany) تهیه شدند.

روش‌ها

تهیه محلول‌های اولیه

برای تهیه محلول کازئیناتی، ابتدا آب دوبار تقطیر را در حمام آبی

برهمکنش‌های دفعی^۱ و عدم سازگاری در سیستم به صورت مجزا قرار گیرند. مهمترین نوع برهمکنش‌های جذبی، برهمکنش الکتروستاتیکی است که بین پروتئین و پلی‌ساکارید با بارهای مخالف رخ می‌دهد. به طور کلی برهمکنش‌های جذبی بین بیوپلیمرها، یا بین پروتئین‌های با بار مثبت در زیر نقطه ایزوالکتریک ($pH < PI$) و پلی-ساکاریدهای آنیونی در pH بالای pK_a ؛ و یا پروتئین با بار منفی ($pH > PI$) و پلی‌ساکاریدهای کاتیونی (مانند کیتوزان) اتفاق می‌افتد. کمپلکس محلول زمانی ایجاد می‌شود که بارهای مخالف دو ماکروبیون موجود در کمپلکس، از نظر تعداد با هم برابر نباشند. در نتیجه شبکه باردار، اجازه حلالیت به کمپلکس را می‌دهد. اما زمانی که بارهای مخالف دو بیوپلیمر همدیگر را خنثی کنند، کمپلکس نامحلول ایجاد شده و در نتیجه تجمع و هم رسوبی اتفاق خواهد افتاد زیرا در این حالت بین ذرات کمپلکس هیچ گونه نیروی دافعه‌ای وجود ندارد و ذرات یکدیگر را نمی‌رانند. نوع کمپلکس‌هایی که تشکیل می‌شود به ویژگی‌های ساختاری پلی‌ساکاریدها مانند وزن مولکولی و سفتی اسکلت، pH، نسبت مولی بین دو بیوپلیمر و قدرت یونی (در سطح پایین معمولاً $> 0/3$) بستگی دارد (Langer *et al.*, 2003). نانوحامل‌های بر پایه کمپلکس‌های پلی‌ساکارید-پروتئین نسبت به نانوحامل‌های پروتئینی، دارای ویژگی‌های فیزیکی و حفاظتی بهتری هستند، چون حضور پلی‌ساکاریدهای آنیونی در لایه بیرونی، موجب می‌شود که به علت تولید نیروی دافعه منفی بالاتر در pHهای مختلف، پایداری سیستم بیشتر شده و از لخته شدن و بزرگ شدن اندازه ذرات و در نتیجه رسوب جلوگیری شود و همچنین ماده فعال درونی (هسته) بهتر حفاظت گردد.

در pHهای خنثی، پلی‌ساکارید با بار منفی یا خنثی نمی‌تواند بر روی سطح پروتئین‌هایی مانند کازئین قرار گیرد. زیرا در این حالت کازئین نیز دارای بار منفی بوده و دافعه الکتروستاتیکی مانع از نزدیک شدن دو بیوپلیمر به هم می‌شود. عدم ایجاد برهمکنش در نهایت منجر به جدایش فاز به مقدار کم یا زیاد می‌شود. مطالعات انجام شده در این زمینه نشان داد که پکتین کم‌استر در محیط اسیدی روی سطح کازئین با بار مثبت قرار می‌گیرد (Lucey *et al.*, 1999) و با ایجاد دافعه الکتروستاتیکی، مانع از توده‌ای شدن کازئین و سبب پایداری ذرات در محیط‌های اسیدی‌تر می‌شود (Pedersen *et al.*, 1991). تحقیقات انجام شده بر روی پکتین با متوکسیل بالا نشان داد که دافعه فضایی نیز به همراه دافعه الکتروستاتیکی نقش مهمی را در پایداری کازئین‌ها خواهند داشت (Jensen *et al.*, 2010). بررسی‌های انجام شده توسط Girard و همکاران (۲۰۰۳) بر روی برهمکنش‌های پکتین کم‌استر (LMP) - بتالاکتوگلوبولین طی تشکیل نانوکمپلکس، نشان داد که اساس این برهمکنش‌ها، بر پایه

قرار گرفتند.

پتانسیل زتا

برای تعیین پتانسیل زتای محلول‌های پکتین و کازئین و همچنین کمپلکس بین آن‌ها، از دستگاه زتا سایزر Nano-ZS (ساخت شرکت Malvern کشور انگلستان) استفاده شد. برای این منظور، هر یک از نمونه‌ها نخست با استفاده از آب مقطر ۵۰ برابر رقیق شدند. سپس نمونه‌ها توسط سرنگی داخل لوله موئین منتقل و لوله موئین در محل مخصوص در داخل دستگاه قرار گرفت. اندازه‌گیری پتانسیل زتا در دمای ۲۵ °C و توان ۱۴۹ وات انجام شد (Sejersen *et al.*, 2007).

تعیین اندازه ذرات

توزیع اندازه ذرات و قطر متوسط آن‌ها در دستگاه آنالیز کننده اندازه ذرات SALD 2101 (ساخت شرکت Shimadzu کشور ژاپن) بر اساس روش تفرق نور لیزر اندازه‌گیری شد. متوسط اندازه ذرات بر اساس میانگین قطر حجمی (معادله ۱) تعیین شد و کلیه نمونه‌ها در سه تکرار اندازه‌گیری شدند.

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

توزیع اندازه ذرات با استفاده از معادله زیر محاسبه شد:

$$Span = \frac{D(90\%) - D(10\%)}{D(50\%)} \quad (2)$$

در این رابطه D(90%): قطری که حجم ذرات کوچکتر از آن، ۹۰ درصد حجم کل ذرات موجود در سیستم را تشکیل می‌دهد. D(50%): قطری که حجم ذرات کوچکتر از آن، ۵۰ درصد حجم کل ذرات موجود در سیستم را تشکیل می‌دهد (قطر میانه). D(10%): قطری که حجم ذرات کوچکتر از آن، ۱۰ درصد حجم کل ذرات موجود در سیستم را تشکیل می‌دهد. میزان اسپن کمتر، نشان دهنده یکنواختی بیشتر توزیع در اندازه ذرات می‌باشد.

میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM)

برای مشاهده تصاویر مربوط به نانوکمپلکس‌ها از میکروسکوپ الکترونی گذاره (Philips CM10 ساخت کشور هلند) و از روش رنگ آمیزی منفی استفاده شد. در ابتدا یک قطره از سوسپانسیون حاوی نانوکمپلکس بر روی گرید مسی (۳۶ HF، ۳/۰۵mm، ساخت کشور استرالیا) با مش ۲۰۰ به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت. در ادامه برای رنگ آمیزی نانوکمپلکس‌ها یک قطره اورانیل استات ۲٪ به مدت ۳۰ ثانیه ریخته شد. گرید مسی با استفاده از فیلتر کاغذی خشک شد و برای آنالیز تصویر در دستگاه TEM قرار گرفت.

(ظرف حاوی آب و یخ) ۴ °C قرار داده و پودر کازئینات سدیم را با مقادیر مختلف ۰/۵، ۱ و ۱/۵ گرم به تدریج به آن اضافه کرده تا حل شود. محلول حداقل باید به مدت ۸ ساعت نگهداری شود تا جذب آب پروتئین به حداکثر مقدار خود برسد. دمای نگهداری پروتئین طی این ۸ ساعت، دمای یخچال می‌باشد. پس از گذشت زمان ۸ ساعت و جذب آب توسط پروتئین، محلول از فیلتر کاغذی واتمن شماره ۴۰ با استفاده از پمپ خالص عبور داده شد.

برای تهیه محلول پکتینی با غلظت‌های ۰/۲، ۰/۴۵ و ۰/۷ w/v، آب دو بار تقطیر بر روی هیتر تا ۸۰-۷۰ °C حرارت داده شد و سپس پودر پکتین طی همزدن مداوم به آب افزوده شد. پس از آن به مدت ۱-۱/۵ ساعت به منظور کاهش دمای محلول، در دمای محیط نگهداری شد. این محلول نیز به منظور کامل شدن جذب آب، حداقل به مدت ۸ ساعت قبل از استفاده، در یخچال نگهداری شد. کلیه محلول‌های مورد استفاده روزانه و به صورت تازه تهیه شدند.

تهیه محلول نانوکمپلکس

پس از تهیه محلول‌های کازئینی، مقدار ۲cc نمک تری پتاسیم سیترات ۰/۴ مولار به محلول افزوده و در ادامه دو محلول نمکی کلرید کلسیم ۰/۰۸ مولار و دی پتاسیم هیدروژن فسفات ۰/۰۸ مولار به ترتیب با مقادیر ۱۰cc و ۱۲cc طی ۸ مرحله و در فاصله زمانی ۱۵ دقیقه به محلول اضافه شدند. در این مرحله پس از رساندن محلول به حجم ۱۰۰ cc و تنظیم pH در حالت خنثی، محلول‌های پکتینی از قبل تهیه شده به محلول پروتئینی افزوده شد. و تیتراسیون تا pH مورد نظر (۳/۹، ۴/۱ و ۴/۳) با HCl ۰/۱ نرمال انجام شد. محلول‌های نانوکمپلکس تهیه شده با غلظت‌های مختلف پکتین و کازئینات سدیم و pH‌های مختلف، در جدول ۲ آورده شده است. کلیه نمونه‌ها در حمام آبی ۴ °C تهیه شدند.

طیف سنجی فرسرخ (FTIR)

برای اندازه‌گیری طیف IR از قرص جامد استفاده شد. ابتدا محلول حاوی کمپلکس در فریزر ۸۰ °C - مدل DF 100-86 (ساخت شرکت Snijder کشور هلند) منجمد شد و سپس در دستگاه لیوفیلیزاتور (مدل Christ α ۱-۴ ساخت کشور آلمان) به شکل پودر جامد خشک در آمد. روش تهیه قرص به این صورت بود که ابتدا پودر لیوفیلیزه شده و برمید پتاسیم با نسبت‌های ۱ به ۱۰ مخلوط شده و آسیاب شدند. سپس در دستگاه تهیه قرص با استفاده از دستگاه پرس به مدت ۲ دقیقه و فشار ۶۰ کیلو پاسکال، به شکل قرص‌های نازک با ضخامت کمتر از ۱ میلی‌متر در آمدند. قرص‌های تهیه شده در عدد موجی ۴۰۰cm⁻¹ - ۴۰۰۰cm⁻¹ و با قدرت تفکیک ۴cm⁻¹ در دستگاه FTIR 8400S (ساخت شرکت Shimadzu کشور ژاپن)، مورد آنالیز

آزمون رئولوژیکی غیرنوسانی (پایا)

اندازه‌گیری ویژگی‌های رئولوژیکی نمونه‌های کمپلکس یک روز پس از آماده‌سازی نمونه‌ها، در دمای 25°C با استفاده از دستگاه رئومتر Physica MCR 301 (Anton Paar ساخت کشور اتریش) مجهز به هندسه استونه‌های هم مرکز با قطر $2/5$ سانتیمتر برای استوانه داخلی و $2/7$ سانتیمتر برای استوانه خارجی انجام شد. برای این منظور، ارتباط تنش برشی و ویسکوزیته به صورت تابعی از سرعت برشی برای تعیین نوع رفتار جریان‌ی نمونه‌ها در فاصله زمانی ۱۰ دقیقه و سرعت برشی $(100-200\text{ s}^{-1})$ اندازه‌گیری شد. درجه برشی اعمال شده در این آزمون به صورت خطی بود.

آنالیز آماری

در این تحقیق از روش فاکتوریل نسبی^۱ سطح پاسخ با طرح آزمایشی Box-behnken و نرم افزار 15 minitab برای آنالیز اندازه ذرات استفاده شد. همچنین داده‌های بدست آمده از سایر آزمون‌ها، با استفاده از نرم افزار Excel رسم شدند. آنالیز مربوط به اندازه و توزیع اندازه ذرات در سه تکرار انجام شد.

نتایج و بحث

طیف سنجی فرو سرخ (FT-IR)

هدف اصلی از آنالیز طیف سنجی IR در این پژوهش، شناسایی گروه‌های شیمیایی نمونه‌های کازئینات سدیم و پکتین و سپس تشخیص تشکیل کمپلکس بین آن‌ها می‌باشد. از آنجا که گروه‌های عاملی مختلف، دارای جذب در فرکانس‌های مشخصی هستند، بنابراین طیف سنجی IR به عنوان وسیله‌ای مناسب برای تعیین ساختار و تغییرات ساختاری در بیوپلیمرها معرفی می‌شود به طوری که عدد موجی بین 1200 cm^{-1} - 950 cm^{-1} گاهی اثر انگشت مولکول نامیده می‌شود (Filippove, 1992). پیک‌های مربوط به محدوده عدد موج 1000 cm^{-1} - 2000 cm^{-1} ، گروه‌های کربوکسیل آزاد و استری شده در انواع مختلف پکتین، مستقل از منبع تولید آن را نشان می‌دهد و می‌تواند برای شناسایی گالاکتورونیک اسید به کار رود. Gnanasambandan و همکاران (۲۰۰۰)، از آنالیز FTIR برای تعیین درجه استریفیکاسیون پکتین استفاده کردند و نشان دادند که محدوده عدد موجی $1745-1760$ و $1620-1640$ ، به ترتیب مربوط به گروه‌های کربوکسیل استری شده و گروه‌های کربوکسیل اسیدی است و با کاهش درجه استریفیکاسیون پکتین، سطح پیک مربوط به عدد موج گروه‌های استری کاهش می‌یابد. گروه کربوکسیل آزاد می‌تواند به دو فرم اسیدی و آنیونی وجود داشته باشد و به ترتیب در عدد موج-

های 1600 و $1550-1650$ اشعه IR را جذب کنند. همچنین با کاهش pH گروه‌های کربوکسیل پکتین قادر است H^+ خود را آزاد کند و فرکانس مربوط به جذب گروه‌های آنیونی را افزایش دهد. در شکل ۱ طیف فروسرخ مربوط به نمونه‌های خالص پکتین و کازئینات سدیم و همچنین کمپلکس این دو بیوپلیمر نشان داده شده است. پیک مربوط به گروه کربوکسیل استری شده در پکتین در عدد موج 1750 cm^{-1} و گروه کربوکسیل غیر استری (آزاد) در عدد موج 1650 مشاهده شد. با توجه به شکل، سطح زیر منحنی در عدد موج 1750 cm^{-1} از 1650 cm^{-1} بزرگتر بوده و پکتین با درجه استریفیکاسیون بالا را نشان می‌دهد. Sato و همکاران (۲۰۱۱)، گروه‌های عاملی پکتین پر استر را از طریق FTIR مورد ارزیابی قرار دادند و نشان دادند که درجه استریفیکاسیون پکتین بر روی پیک‌های ظاهر شده در عدد موجی 1650 و 1750 مؤثر است و با افزایش درجه استریفیکاسیون پیک مربوط به عدد موج 1750 بزرگتر می‌شود. Orona و همکاران (۲۰۱۰)، دو نوع پکتین تجاری سیب و پوست نخود را با FTIR بررسی کردند. نتایج حاصل از تحقیق نشان داد که پکتین تجاری سیب، با درجه استریفیکاسیون بالاتر از ۵۷ درصد، در عدد موجی 1750 جذب بیشتری دارد در صورتیکه پکتین حاصل از پوست نخود کم استر بوده و بیشترین جذب را در عدد موجی 1650 نشان داد.

در طیف مربوط به پکتین (شکل ۱)، عدد موج‌های 2939 cm^{-1} و 2939 cm^{-1} ارتعاشات کششی CH- و پیوندهای هیدروژنی درون مولکولی گروه‌های OH- پکتین را نشان دادند. در این شکل پیک‌های مربوط به پیوندهای هیدروژنی NH- و ارتعاشات کششی گروه‌های N-H کازئینات سدیم، به ترتیب در محدوده طیف‌های 3100 - 3300 و عدد موج 1570 ظاهر شدند (شکل ۱). طیف مربوط به نمونه کمپلکس (شکل ۱)، ظهور پیک جدیدی را در عدد موج 2339 نشان داد. علاوه بر این، در نمونه کمپلکس نسبت به ترکیبات اولیه کازئین و پکتین، جابه‌جایی پیک‌های گروه‌های کربوکسیل پکتین (1750 cm^{-1} و 1650 cm^{-1}) و گروه آمونومی کازئینات سدیم (1570 cm^{-1}) به عدد موج‌های 1652 cm^{-1} و 1544 مشاهده شد که می‌توان این دو پدیده (جابه‌جایی پیک‌های اولیه و ظهور پیک جدید) را به ایجاد پیوندهای الکتروستاتیک بین گروه‌های عاملی NH_3^+ کازئینات و COO^- پکتین نسبت داد. همچنین پیک‌های مربوط به عدد موج محدوده 3100 - 3500 در نمونه کمپلکس، باریک‌تر شده و به سمت چپ متمایل شده است. تیز شدن پیک در این منطقه تشکیل پیوندهای هیدروژنی ضعیف‌تری را در حالت تشکیل کمپلکس نشان می‌دهد. با توجه به نتایج حاصل از این آزمون می‌توان گفت که علاوه بر ایجاد برهمکنش‌های الکتروستاتیک، پیوندهای هیدروژنی نیز در تشکیل کمپلکس‌های کازئین - پکتین دخالت دارد. Grenha و همکاران (۲۰۰۹)، با بررسی

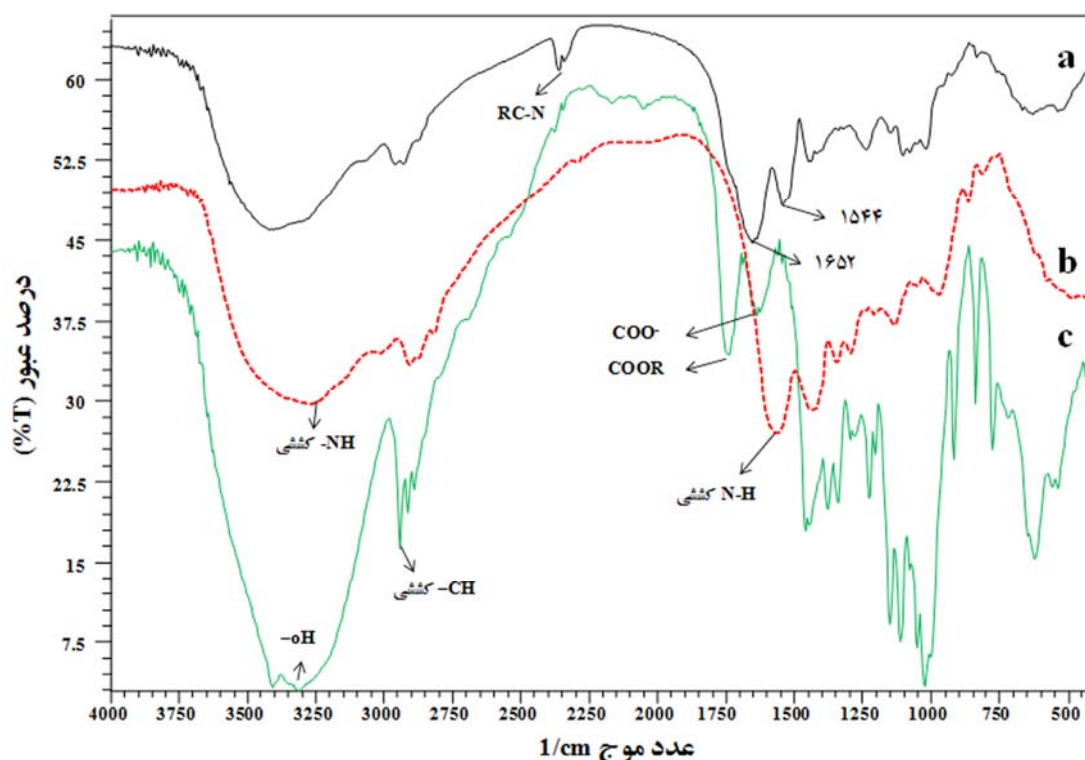
پهن شدن پیک مربوط به محدوده عدد موجی ۳۱۰۰-۳۵۰۰ می‌شود.

اثر تغییرات pH بر پتانسیل زتا و تحرک الکتروفوریتیک

در این پژوهش برای مشخص شدن نحوه عمل نیروهای دافعه الکتروستاتیک بین پکتین و کازئین و میزان پایداری کمپلکس حاصل، از نتایج تحرک الکتروفوریتیک و پتانسیل زتا استفاده شد. پتانسیل زتا یا الکتروسیتیک، اختلاف پتانسیل بین لایه یونی متحرک و لایه غیر متحرک می‌باشد و بهترین شاخص برای تعیین وضعیت الکتریکی سطحی دیسپرسیون‌هاست. زیرا نشان دهنده میزان تجمع بار در لایه غیر متحرک و شدت جذب یون‌های مخالف به سطح ذره است (قنبرزاده، ۱۳۸۸). عوامل مختلفی از جمله pH، قدرت یونی، نوع و غلظت بیوپلیمرهای مورد استفاده، نسبت بین آن‌ها و ... بر روی میزان بار سطحی، تحرک الکتروفوریتیک و پتانسیل زتای کمپلکس مؤثر است.

شکل ۲ الف و ب، اثر pH بر پتانسیل زتا و تحرک الکتروفوریتیک محلول‌های کازئین ۱٪، پکتین ۰/۴۵٪ و کمپلکس بین آن‌ها را نشان می‌دهد. مطابق شکل، زمانی که پکتین در محیط حضور ندارد با تغییر pH محیط از ۷ به ۳، تحرک الکتروفوریتیک و پتانسیل زتای کازئینات افزایش می‌یابد.

طیف FTIR مربوط به نانوذرات حاصل از کمپلکس بین کیتوزان و کاراگینان، پیک جدیدی در عدد موج ۱۵۳۰ (مربوط به گروه NH_3^+) مشاهده کردند که در هیچ یک از طیف‌های مربوط به کیتوزان و کاراگینان وجود نداشت. همچنین، پیک‌های مربوط به گروه‌های آمیدی در حالت تشکیل کمپلکس، جابه‌جایی کمی نشان دادند. این دو عامل نشان‌دهنده ایجاد برهمکنش الکتروستاتیک بین گروه‌های ناهمنام کیتوزان و کاراگینان اعلام شد. مطالعات انجام شده توسط Li و همکاران (۲۰۱۱)، بر روی نانوذرات کیتوزان - آلژینات، نشان داد که با ایجاد برهمکنش بین این دو ترکیب، پیک‌های نامتقارن و متقارن مربوط به گروه‌های کربوکسیلات از ۱۶۱۷ و ۱۴۱۷ به ۱۶۳۷ و ۱۴۱۵ منتقل شدند. همچنین پیک مربوط به عدد موج ۱۵۹۹ کیتوزان، در هنگام برهمکنش با آلژینات به ۱۵۵۹ انتقال یافت. بررسی میکروذرات کیتوزان و آلژینات با استفاده از روش FTIR توسط Honari و همکاران (۲۰۰۹)، انجام شد. این محققین، ناپدید شدن پیک‌های مربوط به ارتعاشات خمشی گروه N-H امید نوع دوم کیتوزان در عدد موجی ۱۵۷۰ و ارتعاشات کششی متقارن و نامتقارن C-O- در ۱۴۷۰ را دلیل ایجاد برهمکنش‌های الکتروستاتیک بین NH_3^+ کیتوزان و COO^- آلژینات اعلام کردند. در این تحقیق همچنین، اثر کیتوزان با وزن مولکولی مختلف بر تشکیل کمپلکس بررسی شد و نشان داد که کیتوزان با وزن مولکولی بالاتر، با ایجاد پیوند هیدروژنی قوی‌تر، سبب



شکل ۱- طیف FTIR نمونه‌های a: کمپلکس پکتین - کازئین، b: کازئینات سدیم و c: پکتین پر استر

بتا لاکتوگلوبولین و پکتین قرار داشته و نقطه ایزو الکتریک نانوکمپلکس حاصل ۲/۲۶ می‌باشد. همچنین تحقیقات Ye و همکاران (۲۰۰۶) نیز پتانسیل زتای محلول کازئینات- صمغ عربی را در اکثر pHها، بین پتانسیل زتای محلول خالص این دو بیوپلیمر نشان داد. این نتایج با نتایج حاصل از این تحقیق، مطابقت نداشت. برخلاف نتایج گزارش شده توسط Surh و همکاران (۲۰۰۶)، در این تحقیق، مقادیر زتا پتانسیل محلول کازئینات-پکتین بین مقادیر آن در محلولهای خالص کازئینات و پکتین خالص قرار نداشت. در $pH < pI$ ، بار سطحی هر دو بیوپلیمر منفی است و در نگاه اول به نظر می‌رسد که دافعه قوی الکتروستاتیک مانع از نزدیک شدن پکتین به کازئین و جذب بر سطح آن می‌شود و در نتیجه هیچ گونه برهمکنشی بین آنها اتفاق نمی‌افتد. اما طبق نتایج بدست آمده در pHهای ۶ و ۷، مشاهده می‌شود که بار الکتریکی منفی در نمونه کمپلکس، بسیار بیشتر از نمونه‌های خالص کازئین و پکتین بوده و برابر با مجموع بارهای منفی پکتین و کازئین می‌باشد. احتمالاً در این شرایط، یک نیروی جاذبه از نوع آبگریز (به علت وجود گروه‌های متیل در پکتین و اسیدهای آمینه غیر قطبی در کازئین) و همچنین جاذبه الکتروستاتیک وجود دارد و سبب ایجاد برهمکنش بین این دو ترکیب شده است (Surh et al., 2006; Gu et al., 2004). نیروی جاذبه الکتروستاتیک قطعاً بین گروه‌های کربوکسیل پکتین با بار منفی و بخش‌هایی از سطح کازئین که دارای بار مثبت است ($-NH_3^+$) بصورت محدود اتفاق می‌افتد که البته منجر به کمپلکس وسیع نمی‌شود. در نتیجه این برهمکنش‌ها، بار منفی سطحی ذره که ناشی از وجود دو ترکیب پکتین و کازئین است، افزایش می‌یابد و در نتیجه پتانسیل زتای منفی، مجموع بارهای هر دو بیوپلیمر را نشان می‌دهد. Surh و همکاران (۲۰۰۶)، با بررسی اثر pH و پکتین بر بار سطحی قطرات امولسیون پایدار شده با کازئین، نشان دادند که در $pH=5$ افزودن پکتین، سبب منفی‌تر شدن بار کمپلکس شد. به طوریکه مقدار پتانسیل زتا از $-18 mV$ در غیاب پکتین به $-37 mV$ برای پکتین کم استر و $-35 mV$ برای پکتین پر استر رسید. این نتیجه به دلیل ایجاد برهمکنش بین گروه کربوکسیل پکتین و بخش‌های مثبت کازئین بیان شد. نتایج بدست آمده توسط Gu و همکاران (۲۰۰۴)، با بررسی اثر انواع کاراگینان و pH بر پتانسیل زتا، این مطلب را تأیید کردند. مطابق نتایج Jones و همکاران (۲۰۱۰) مقادیر زتا پتانسیل در $pH=4/75$ برای محلولهای بتا لاکتوگلوبولین حاوی کاراگینان، پکتین کم استر و پکتین پر استر به ترتیب -57 ، -44 ، -26 میلی ولت بود که نسبت به محلول بتا لاکتوگلوبولین تنها در این pH (یعنی $7/3$ میلی ولت) بسیار بیشتر بود. همچنین در این pH، مقادیر زتا پتانسیل برای محلولهای خالص کاراگینان، پکتین کم استر و پکتین پر استر به ترتیب -43 ، -45 و -29 میلی ولت بود که نشان دهنده افزایش زتا پتانسیل نسبت به بتا لاکتوگلوبولین تنها و افزایش و یا کاهش جزئی

بار الکتریکی کازئین در pH خنثی و قلیایی منفی است و زمانی که pH محیط کاهش یافته و به زیر نقطه ایزوالکتریک آن برسد، در اثر پروتونه شدن، بار آن مثبت می‌شود (Surh et al., 2006). این نتایج نشان دادند که پتانسیل زتا و تحرک الکتروفوریتیک کازئین با کاهش pH از ۷ به ۳ به ترتیب از -20 به $+22$ و از $-1/4$ به $+1/7$ تغییر یافت. شبکه بارهای الکتریکی کازئین در pHهای مابین ۴ و ۵ به صفر نزدیک شد و خنثی شدن بار الکتریکی کازئین و نزدیک شدن به نقطه ایزوالکتریک آن را نشان داد. در نتایج مشابهی، پژوهش‌های Ye و همکاران (۲۰۰۶) بر روی نانوکمپلکس کازئینات- صمغ عربی نشان داد که پتانسیل زتای محلول کازئینات خالص $0/1$ درصد، با کاهش pH از ۷ به ۲، از -28 به $+25$ میلی ولت می‌رسد و در pH $4/7$ بار خالص آن صفر می‌شود.

در پژوهش ما، مقادیر پتانسیل زتای محلول پکتین نیز با کاهش pH از ۷ به ۳ از حدود -20 به $+10$ رسید. جالب اینکه یکباره تغییرات شدیدی در بین pH 4 تا 3 مشاهده می‌شود و تا $pH 3/4$ (یعنی pK_a) هنوز مقادیر پتانسیل زتا منفی است. البته تحقیقات Chanasatru و همکاران (۲۰۰۹) روی نانوکمپلکس پکتین-بتا لاکتوگلوبولین نشان داد که، با کاهش pH از ۷ به ۳، مقادیر پتانسیل زتای پکتین حاصل از چغندر منفی باقی می‌ماند ولی مقادیر بار منفی آن کاهش می‌یابد. مطابق پژوهش‌های Ye و همکاران (۲۰۰۶) در محدوده pH 7 تا 4 ، پتانسیل زتای محلول صمغ عربی $0/1$ درصد، شدیداً منفی است (حدود -25 میلی ولت) و در زیر pH 4 افزایش یافته و نهایتاً در pH 2 بار خالص صفر می‌گردد.

همانطور که در شکل مشاهده می‌شود، افزودن پکتین به محلول کازئینات، سبب ایجاد تغییراتی در میزان بار الکتریکی سطحی، تحرک الکتروفوریتیک و در نتیجه پتانسیل زتا شد و به طور کلی آن‌ها را منفی‌تر کرد. میزان این تغییرات تحت تأثیر pH محیط متفاوت بود. به عنوان مثال با کاهش pH از ۷ به ۶ در محلول حاوی دو بیوپلیمر، کاهش در بار الکتریکی چندان محسوس به نظر نرسید و میزان پتانسیل زتا از $-32/7$ به $-30/9$ رسید ولی با کاهش بیشتر pH، تغییرات ایجاد شده بسیار قابل توجه بود به طوریکه این مقدار در $pH=3$ به $+5/87$ رسید. Gu و همکاران (۲۰۰۴) با بررسی برهمکنش‌های الکتروستاتیک بین پلی‌ساکاریدهای آنیونی و پروتئین در محیط آبی و امولسیون نشان دادند که یکی از عوامل مؤثر بر میزان تحرک الکتروفوریتیک و پتانسیل زتا، pH محیط می‌باشد. Anal و همکاران (۲۰۰۸) نیز با بررسی اثر pH بر پتانسیل زتای کیتوزان و کازئین گزارش کردند که pH بر پتانسیل زتا اثر داشته و مقدار آن در حالت تشکیل کمپلکس، در مقادیر میانی کیتوزان و کازئین قرار دارد. Zimet و همکاران (۲۰۰۹)، با بررسی تحرک الکتروفوریتیک نانوکمپلکس پکتین و بتا لاکتوگلوبولین حاوی اسید چرپ DHA، اعلام کردند که میزان آن بین مقادیر محلولهای خالص

پایداری محلول‌های آن بیشتر از محلول کازئیناتی خالص باشد. داشتن نیروی دافعه الکترواستاتیک بالا برای جلوگیری از لخته شدن و پایدار ماندن سیستم کلوئیدی لازم است و سوسپانسیون‌های با زتا پتانسیل بیش از ۲۰ میلی ولت معمولاً پایداری کلوئیدی مناسبی نشان می‌دهند (Ron *et al.*, 2010; Zimet *et al.*, 2009).

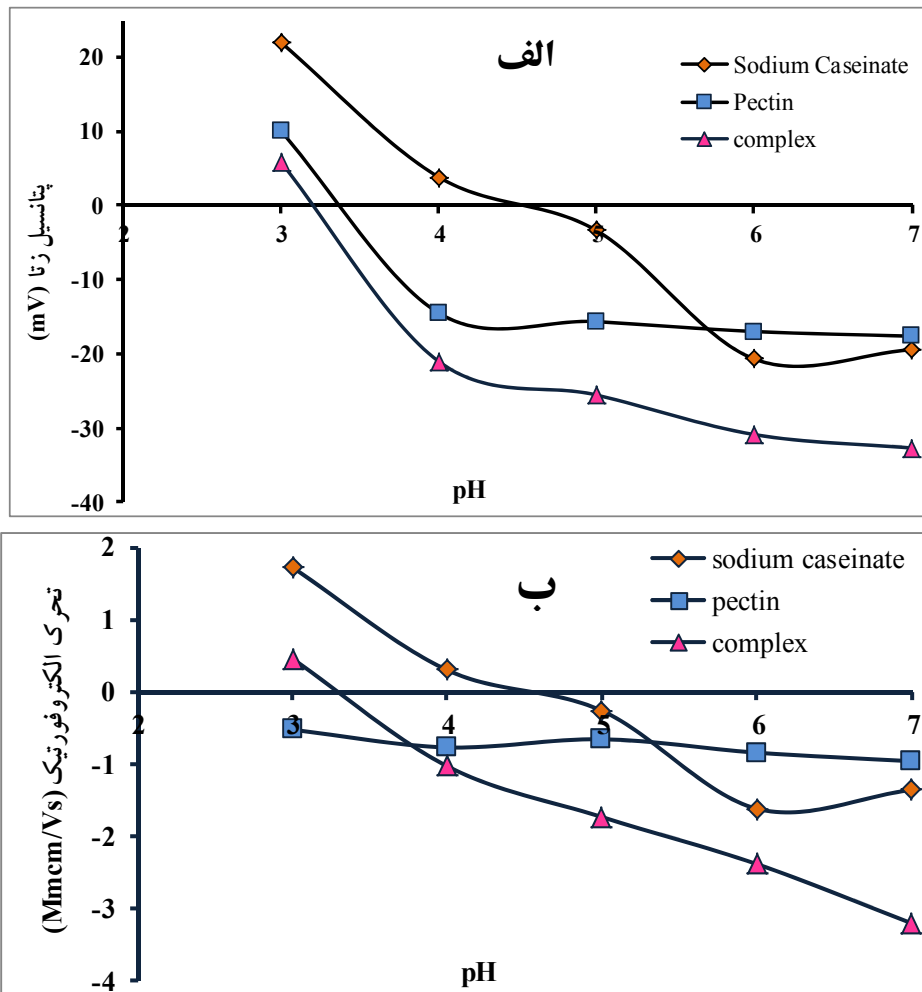
علاوه بر pH، نوع و نسبت دو پلیمر و نوع هسته پوشش داده شده نیز بر زتا پتانسیل نانوکمپلکس موثر است. Bedie و همکاران (۲۰۰۸) در پژوهشی اثر نسبت‌های بیوپلیمرهای پروتئین آب پنیبر ایزوله شده و پکتین کم استر را در گستره وسیعی از pH (۶-۲) بررسی کرده و گزارش کردند که در pH کمتر از ۳، نسبت بین بیوپلیمرها در میزان برهمکنش و پتانسیل زتا مؤثر بوده بطوریکه کاهش نسبت پکتین به کازئین، سبب می‌شود تا پتانسیل زتا کمی مثبت شده و پایداری محلول کاهش یابد. همچنین تحقیقات Ye و همکاران (۲۰۰۶) نشان داد که افزایش نسبت صمغ عربی به کازئینات موجب کاهش pH خنثی شدن (نقطه ایزو الکتریک) کمپلکس می‌شود. Luo و همکاران (۲۰۱۱) طی کار بر محلول‌های نانوکمپلکس زئین-کیتوزان حاوی آلفا توکوفرول نشان دادند که محلول‌های زئین-توکوفرول، دارای زتا پتانسیل بصورت جزئی منفی (۲/۸- میلی ولت) می‌باشند و با افزایش مقدار توکوفرول مقادیر زتا پتانسیل منفی کمی کاهش می‌یابد که نشان دهنده شرکت پیوندهای الکترواستاتیک علاوه بر پیوندهای آگریز در فرایند انکپسولاسیون است. زیرا زئین و توکوفرول دارای بار مخالف هم بوده و به ترتیب دارای زتا پتانسیل ۲/۸- و ۱۳/۱+ هستند. با افزودن کیتوزان که پلی‌ساکاریدی با بار مثبت در pH خنثی است، پتانسیل زتا به شدت مثبت گردید (۲۲/۸+ تا ۴۰/۹+ میلی ولت) که نشان دهنده پوشش داده شدن زئین حاوی توکوفرول توسط لایه کیتوزان می‌باشد. نانوکمپلکس تشکیل شده قابلیت بسیار بالایی در کاربردهای رهایش کنترل شده می‌تواند داشته باشد، زیرا می‌تواند به راحتی با غشاهای زیستی با بار منفی در داخل بدن بر همکنش دهد.

همانطور که در شکل ۲ ب مشاهده می‌شود تحرک الکتروفوریتیک محلول کازئینی به pH وابسته بوده و در pH‌های زیر نقطه ایزوالکتریک مقدار مثبتی را نشان داد. این مقدار با کاهش pH از ۷ به ۳ از ۱/۱۳۶- به ۱/۷۲+ افزایش یافت. اما این وابستگی در مورد پکتین مشاهده نشد و در تمامی pH‌های آزمایشی مقدار آن تقریباً ثابت باقی ماند. همچنین نمودار مربوط به کمپلکس بین کازئین و پکتین نیز، کاهش در میزان تحرک الکتروفوریتیک را با کاهش pH نشان داد.

نتایج تحرک الکتروفوریتیک، موقعیت مکان پیوند اشغال شده را تعیین و برای بررسی میزان تمایل پیوند الکترواستاتیک بین پکتین و کازئین استفاده می‌شود. زیرا تحرک الکتروفوریتیک رابطه مستقیمی با بار خالص ذرات کلوئیدی دارد و همچنین تعداد مکان پیوند بین پروتئین و پلی‌ساکارید را نشان می‌دهد.

نسبت به محلول‌های خالص پلی‌ساکاریدهای آنیونی است و این نشان می‌دهد که محلول کمپلکس این دو بیوپلیمر می‌تواند از نظر دافعه الکتریکی پایدارتر از محلول‌های خالص پروتئین بتا لاکتوگلوبولین به عنوان یک نانوحامل باشد. Surh و همکاران (۲۰۰۶) اثر دو نوع متفاوت پکتین (کم استر و پراستر) را بر ایجاد برهمکنش با کازئین و همچنین پتانسیل زتا و پایداری سیستم کلوئیدی، در pH‌های مختلف مورد ارزیابی قرار دادند. طبق نتایج بدست آمده توسط این محققین، پتانسیل زتای مربوط به نمونه‌های کمپلکس از لحاظ اندازه، مابین پکتین و کازئین قرار داشت و اختلاف معنی‌داری بین دو نوع پکتین در میزان پایداری کل در محیط اسیدی مشاهده نشد. به نظر می‌رسد که پکتین کم استر به دلیل داشتن گروه‌های کربوکسیل آزاد بسیار زیاد در سطح خود، نقش مهم‌تری در ایجاد برهمکنش و پایداری پروتئین کاتیونی دارد. اما برخلاف انتظار، این محققین ثابت کردند که اثر هر دو نوع پکتین بر پتانسیل زتا و پایداری کازئین در pH‌های اسیدی، مشابه است و به درجه استری شدن و بار کلی سطح وابستگی کمتری دارد. زیرا در ابتدا که pH کاهش می‌یابد؛ بار الکتریکی هر دو نوع پکتین کاهش یافته، تا به یک مقدار مشخصی در بالاتر از pka پکتین برسد و پس از آن با کاهش بیشتر pH، بار الکتریکی تقریباً ثابت می‌ماند و اثر معنی‌داری بر میزان پایداری یا پتانسیل زتا ندارد. در این خصوص Schonhoff (۲۰۰۳) با انجام تحقیقاتی بر روی جذب پلی‌الکترولیت‌های سنتزی بر سطوح با بار مخالف گزارش کردند که مقدار پتانسیل زتای نهایی به دانسیته بار پلی‌الکترولیت جذب شده وابستگی بسیار کمی دارد.

در این تحقیق، در غیاب پکتین، شبکه بار الکتریکی کازئین در pH‌های ۴ و ۳ مثبت بود و مقدار آن در حدود ۳/۸۴+ و ۲۲+ مشاهده شد زیرا کازئین در این شرایط (زیر نقطه ایزوالکتریک) دارای بار مثبت است. تغییرات بار بین pH ۳ و ۴ برای محلول‌های پکتین و پکتین-کازئینات نیز بسیار قابل توجه بود و در محلول پکتین-کازئینات، بار الکتریکی از ۲۱/۰۳- در pH=۴ به ۵/۸۷+ در pH=۳ کاهش یافت علت این امر را می‌توان به پروتونه شدن مقدار زیادی از گروه‌های کربوکسیل (-CO₂H) موجود در سطح پکتین در این محدوده pH نسبت داد (Thakur *et al.*, 1997). در این شرایط (pH=۳) مولکول‌های پکتین به دلیل کاهش شدید در بارهای الکتریکی منفی خود، با قدرت کمتری با کازئین پیوند می‌دهند. کاهش قدرت پیوند، سبب افزایش طول پیوند بین آن‌ها شده و اندازه ذرات کمپلکس را افزایش می‌دهد که این موضوع کاملاً با نتایج بدست آمده از اندازه ذرات در این پژوهش تطابق دارد. با توجه به نتایج بدست آمده، pH=۴/۱ از نظر مقدار بار خالص برای ایجاد دافعه الکترواستاتیک، مناسب است و در این pH کمترین اندازه ذره‌ای برای کمپلکس نیز مشاهده شد. با توجه به مقادیر بالای منفی پتانسیل زتا در کمپلکس در pH=۴/۱، انتظار می‌رود به علت وجود نیروی دافعه الکترواستاتیک بالاتر،



شکل ۲- پتانسیل زتا (الف) و تحرک الکتروفوریتیک (ب) کازئین، پکتین و کمپلکس حاوی کازئینات سدیم ۱٪ و پکتین ۰/۴۵ درصد در pHهای ۳-۷

الکتروفوریتیک در لحظه اشباع می‌باشد.

از معادله ۴ و ۵ معادله زیر بدست می‌آید:

$$\mu = \mu_0 - (\mu_0 - \mu_{sat}) \left(\frac{KC_{pec}}{1 + KC_{pec}} \right) \quad (۶)$$

در این معادله C_{pec} غلظت پکتین آزاد بوده و می‌توان آن را با غلظت کل پکتین جایگزین کرد.

با استفاده از معادلات بالا و جایگزاری داده‌های مربوط به تحرک الکتروفوریتیک (جدول ۱)، میزان ثابت $k = 2/84$ برای پکتین در $pH=3$ بدست آمد که میزان کشش بالا و تمایل زیاد پکتین برای ایجاد پیوند با کازئینات سدیم را نشان داد. در تحقیقی مشابه، Ron و همکاران (۲۰۱۰)، ثابت پیوند ظاهری پکتین نسبت به بتالاکتوگلوبولین را در گستره وسیعی از pH مورد ارزیابی قرار دادند. در این تحقیق، بالاترین ثابت پیوند (۴/۰۹) در $pH=4/25$ بدست آمد.

در این تحقیق به منظور تعیین تعداد مکان‌های پیوند از مدل ایزوترم جذب Langmuier استفاده شد. مدل Langmuier ثابت جذب k را نشان می‌دهد که برابر با نسبت ثابت جذب (تعداد پیوند ایجاد شده θ) به دفع (تعداد بخش‌های آزاد بدون پیوند $(1-\theta)$) است.

$$K = \frac{K_{ads}}{K_{des}} = \frac{\theta}{(1-\theta)C} \quad (۳)$$

$$\theta = \frac{KC}{1 + KC} \quad (۴)$$

در این معادله C فشار گاز در مدل اصلی Langmuier و k ثابت جذب می‌باشد.

می‌توان θ را از روی میزان تحرک الکتروفوریتیک تخمین زد.

$$\theta = \frac{\mu_0 - \mu}{\mu_0 - \mu_{sat}} \quad (۵)$$

در این معادله μ_0 تحرک الکتروفوریتیک در لحظه صفر، μ تحرک الکتروفوریتیک در شرایط مورد نظر و μ_{sat} تحرک

چشم می‌خورد. در غلظت ۱/۵٪ کازئینات سدیم و مقدار ثابت پکتین (۰/۴۵٪)، افزایش pH سبب کاهش در اندازه ذرات از ۵۹۲۱ به تقریباً ۱۷۴۵ نانومتر گردید. افزایش pH سبب می‌شود که میزان نیروی دافعه منفی کمپلکس افزایش یابد (با توجه به نتایج پتانسیل زتا) و در نتیجه از فلاکولاسیون ذرات کوچک کمپلکس و بزرگ شدن آنها جلوگیری گردد. همچنین با توجه به نتایج پتانسیل زتا، در pHهای پایین‌تر از ۴، به علت کاهش بار منفی پکتین، قدرت پیوند بین پکتین-کازئینات کاهش می‌یابد که موجب افزایش قطر کمپلکس حاصل می‌گردد. همچنین ملاحظه می‌شود که اندازه ذرات کمپلکس در صورت ثابت در نظر گرفتن pH، با زیاد شدن غلظت کازئینات سدیم بیشتر می‌شود که این اتفاق در pH ۳/۹ محسوس‌تر به نظر می‌رسد این نتایج با منفی بودن ضریب همبستگی اثر متقابل بین کازئینات سدیم و pH کاملاً مطابقت دارد. به عبارت دیگر می‌توان گفت که کاهش غلظت کازئینات سدیم و افزایش همزمان pH، اندازه ذرات را کاهش می‌دهد. نتایج بدست آمده، کمترین اندازه ذرات را در کمپلکس حاوی ۱٪ کازئینات سدیم، پکتین ۰/۴۵٪ و pH= ۴/۱ نشان داد بطوریکه میانگین حجمی قطر برای کمپلکس مذکور ۸۶ نانومتر بود.

تحقیقات انجام شده توسط Tuinier و همکاران (۲۰۰۲) نشان داد زمانی که pH نوشیدنی اسیدی شیر به pKa پکتین (۳/۵) نزدیک شود، احتمالاً تمایل پکتین برای جذب شدن در سطح ذرات کازئین به دلیل کاهش بار الکتریکی سطحی آن، کاهش می‌یابد. همانطور که مشاهده می‌شود غلظت ۰/۴۵٪ پکتین با ۱٪ کازئینات سدیم بهترین برهمکنش را از نظر تشکیل نانوکمپلکس در pH=۴/۱ داشته و با کم و زیاد شدن pH در این شرایط، میزان تمایل پکتین و کازئین به یکدیگر به ترتیب کاهش و افزایش می‌یابد. اثر pH بر اندازه ذرات سیستم‌های متشکل از پلی‌ساکارید-پروتئین در پژوهش‌های دیگر محققان نیز ذکر شده است.

اثر تغییرات pH بر اندازه ذرات کمپلکس

نتایج مربوط به اندازه‌گیری قطر متوسط اندازه ذرات (جدول ۲) نشان داد که متوسط قطر حجمی و توزیع اندازه ذرات به ترتیب در محدوده ۱۲۳۰۳-۸۶ نانومتر و ۵/۹۵۱۴۵ - ۰/۷۱۵۲۸ قرار دارند. در جدول ۳ اثر متغیرهای مستقل بر اندازه ذرات نشان داد که تقریباً تمامی متغیرهای مستقل بر اندازه ذرات اثر معنی داری داشته اند. بر طبق آنالیزهای رگرسیونی، هر چه ارزش t بالاتر و ارزش P کمتر باشد، اثر پارامتر مربوطه معنی‌دارتر است. نتایج جدول ۳ نشان داد که pH به طور قابل ملاحظه‌ای بر اندازه ذرات مؤثر است و بیشترین اثر به ترتیب به اثر متقابل پکتین - pH (P=۰/۰۰۰ و t= +۷/۰۹۰)، pH (P=۰/۰۰۰ و t= -۶/۹۹۵) و سپس اثر متقابل بین کازئینات سدیم و pH (P=۰/۰۰۲ و t= -۳/۵۴۹) مربوط می‌شود و همگی در سطح ۱٪ معنی دار هستند. علامت مثبت قبل از ضریب همبستگی پارامترها در معادلات چند جمله‌ای نشان می‌دهد که با افزایش پارامتر مورد نظر (متغیر مستقل) نتیجه نیز افزایش می‌یابد و به عبارت دیگر علامت منفی نشان می‌دهد که بین متغیر مستقل و وابسته رابطه عکس وجود دارد. به عنوان مثال ضریب همبستگی منفی برای pH نشان می‌دهد که افزایش pH، سبب کاهش در اندازه ذرات می‌شود. همچنین ضریب همبستگی اثر متقابل پکتین - pH مثبت بوده و نشان می‌دهد که این دو پارامتر به طور همزمان اثر تشدید کننده‌ای در اندازه ذرات دارند. به این صورت که افزایش pH سبب می‌شود که چگالی بار منفی پکتین افزایش یابد (نتایج مربوط به پتانسیل زتا)، از طرف دیگر افزایش غلظت پکتین نیز چگالی بار منفی کل را افزایش می‌دهد و این دو عامل همزمان سبب می‌شوند تا بار منفی کل و به دنبال آن پایداری سیستم افزایش و اندازه ذرات کمپلکس تشکیل شده نیز کاهش یابد.

در شکل ۳ الف، اندازه ذرات به عنوان تابعی از غلظت کازئینات سدیم - pH نشان داده شده است. با توجه به شکل مشاهده می‌شود که در تمامی غلظت‌های کازئین (۰/۵، ۱ و ۱/۵) و مقادیر ثابت پکتین (۰/۴۵)، با افزایش pH از ۳/۹ به ۴/۳ اندازه ذرات کاهش می‌یابد و این تغییرات در اندازه ذرات، در مقایسه بالای کازئینات سدیم بیشتر به

جدول ۱- مقادیر ثابت پیوند، θ ، μ_0 ، μ و μ_{sat} در سیستم کازئینات سدیم - پکتین در سطوح مختلف pH

pH	μ_0 (10^{-6} Mmcm / V_s)	μ (10^{-6} Mmcm / V_s)	μ_{sat} (10^{-6} Mmcm / V_s)	θ	k (l / M))
۳	۱/۷۲۴۶	۰/۴۶۰۲	-۰/۵۲۷۶	۰/۵۶۱۳	۲/۸۴
۴	-۰/۳۰۱۳	-۱/۰۳۱۲	-۱/۱۳	-۰/۹۳۰۹	۲۹/۹۷
۵	-۰/۲۶۳	-۱/۷۳۷	-۱/۰۰۵۶	۱/۹۸۴۷	-۴/۴۷
۶	-۱/۶۲۱۳	-۲/۳۸۸۳	-۱/۲۲۱۶	-۱/۹۱۹۱	-۱/۴۶
۷	-۱/۳۶۲	-۳/۲۰۸۶	-۱/۴۳۱۳	۲۶/۶۳۴۶	-۲/۳۰۸

جدول ۲- اثر pH بر اندازه و توزیع اندازه ذره‌ای در غلظت‌های مختلف کازئین و پکتین

span	میانگین قطر حجمی (nm) ± انحراف معیار	C*	B*	A*
۵/۸۲± ۰/۰۲	۶۴۸± ۵۸	-/۲	۱	۴/۳
۳/۰۹± ۰/۱۵	۱۰۵۲۹± ۲۳۰	-/۲	۱	۳/۹
۱/۳۳± ۰/۰۳	۷۲۳± ۲۵	-/۷	۱	۴/۳
-/۹۳± ۰/۰۲	۸۶± ۵	-/۴۵	۱	۴/۱
۴/۸۴± ۰/۰۱	۱۶۴۵± ۱۴۹	-/۴۵	-/۵	۴/۳
۴/۶۲± ۰/۰۲	۲۲۰۰± ۱۰۳	-/۷	-/۵	۴/۱
۵/۹۵± ۰/۰۲	۱۷۴۳± ۱۴۱	-/۴۵	-/۵	۳/۹
۲/۸۵± ۰/۰۶	۶۱۵۷± ۱۰۸	-/۴۵	۱/۵	۳/۹
-/۸۹± ۰/۶۷	۹۹± ۶	-/۴۵	۱	۴/۱
۴/۹۰± ۰/۱۲	۶۳۹± ۴۴	-/۲	۱	۴/۳
-/۹۳± ۰/۵۳	۹۳± ۸	-/۴۵	۱	۴/۱
-/۸۷± ۰/۰۵	۸۶± ۵	-/۴۵	۱	۴/۱
-/۸۳± ۰/۰۱	۳۸۰± ۸	-/۷	۱	۳/۹
۴/۴۲± ۰/۰۹	۲۱۰۰± ۸۶	-/۷	-/۵	۴/۱
-/۷۹± ۰/۱۵	۱۰۹۴± ۷۲	-/۷	۱/۵	۴/۱
۴/۵۸± ۰/۲۳	۲۲۱۸± ۴۲۸	-/۴۵	-/۵	۴/۳
-/۸۳± ۰/۱۵	۷۹۳± ۵۴	-/۷	۱	۴/۳
۲/۶۷± ۰/۰۰	۱۵۰± ۳۰۵	-/۲	-/۵	۴/۱
۲/۸۴± ۰/۰۱	۱۲۰۲۵± ۳۳۷	-/۲	۱/۵	۴/۱
-/۹۶± ۰/۰۱	۹۳± ۶	-/۴۵	۱	۴/۱
-/۷۶± ۰/۰۰	۶۲۲± ۱۱	-/۴۵	۱	۴/۳
-/۷۸± ۰/۰۳	۶۲۶± ۶۴	-/۴۵	۱	۴/۳
۲/۹۰± ۰/۰۶	۱۲۳۰۳± ۱۸۴	-/۲	۱	۳/۹
-/۷۱± ۰/۰۹	۹۴± ۱	-/۴۵	۱	۴/۱
-/۸۳± ۰/۲۴	۱۱۹± ۳۸	-/۷	۱/۵	۴/۱
-/۸۸± ۰/۰۱	۳۲۲± ۲	-/۷	۱	۳/۹
۲/۸۴± ۰/۰۸	۱۲۰۶۹± ۸۴۸	-/۲	۱/۵	۴/۱
۵/۹۵± ۰/۰۴	۱۷۵۸± ۱۴۰	-/۴۵	-/۵	۳/۹
۲/۸۴± ۰/۲۹	۵۹۲۱± ۴۰۹	-/۴۵	۱/۵	۳/۹
۲/۶۷± ۰/۰۰	۱۵۰± ۳۱۸	-/۲	-/۵	۴/۱

A*: pH, B*: کازئینات سدیم و C*: پکتین

جدول ۳- آنالیز رگرسیونی اثر pH بر اندازه ذرات

ارزش P	ارزش T	ضریب همبستگی	
۰/۸۴۲	۰/۲۰۲	۹۱/۸۳	ثابت معادله
۰/۰۰۰	-۶/۹۹۵	-۱۹۹۴/۹۴	pH
۰/۰۳۰	۲/۳۴۴	۹۶۱/۵۸	[pH] ²
۰/۰۰۲	-۳/۵۴۹	-۱۳۹۹/۰۰	pH × کازئینات سدیم
۰/۰۰۰	۷/۰۹۰	۲۷۹۴/۸۸	pH × پکتین

تقریباً ثابت می‌ماند ولی در pH زیر ۴، افزایش شدیدی می‌یابد. در این حالت، اندازه ذرات در محلول‌های حاوی پکتین پر استر-

Jones و همکاران (۲۰۱۱) اعلام کردند که با کاهش pH از ۷ تا ۴، اندازه ذرات در مورد محلول پکتین کم استر-بتا لاکتوگلوبولین

pH مناسب (با در نظر گرفتن غلظت‌های ثابت کازئینات سدیم) برای تشکیل نانوکمپلکس بین پکتین و کازئین، با کاهش پکتین افزایش می‌یابد. این امر به دلیل کاهش بار الکتریکی سطحی پکتین در pH‌های پایین‌تر است. تحقیقات Zimet و همکاران (۲۰۰۹)، بر روی کمپلکس پکتین-بتا لاکتوگلوبولین حاوی اسید چرب DHA نشان داد که افزایش غلظت پکتین تا حد معینی باعث کاهش اندازه کمپلکس حاصل می‌شود و ذرات با کمترین قطر (۱۱۰ نانومتر) در غلظت بین ۰/۳۷۵ و ۰/۱۲۵ درصد پکتین حاصل می‌شوند و بالاتر از غلظت ۰/۱۲۵ درصد دوباره قطر افزایش می‌یابد که با نتایج تحقیقات ما مطابقت دارد. پژوهش‌های Luo و همکاران (۲۰۱۱) بر روی کمپلکس زئین-کیتوزان حاوی توکوفرول نشان داد که با افزودن کیتوزان به محلول زئینی به نسبت ۱ به ۲۰، اندازه ذرات از ۸۰۰ به ۲۱۱ نانومتر کاهش می‌یابد و سپس با افزایش غلظت آن به نسبت ۱ به ۱۰ و ۱ به ۵، اندازه ذرات دوباره افزایش می‌یابد. همچنین با افزایش غلظت پروتئین زئین از ۵ به ۱۵ میلی گرم بر میلی لیتر، در نسبت ۱۰ به ۱ زئین به کیتوزان، اندازه ذرات کاهش می‌یابد و سپس با افزایش غلظت به ۲۰ میلی گرم دوباره اندازه افزایش می‌یابد. همچنین، تحقیقات Ron و همکاران (۲۰۱۰)، بر روی کمپلکس پکتین-بتا لاکتوگلوبولین حاوی ویتامین D₂ نشان داد که حداقل اندازه ذرات (۴۹-۵۰ نانومتر) در PH ۴/۲۵ و غلظت پکتین ۰/۰۵ و ۰/۰۷۵ درصد به دست آمد و خارج از این محدوده غلظت، اندازه ذرات افزایش یافت. با افزایش pH به ۴/۵ (نزدیک نقطه ایزوالکتریک پروتئین) اندازه ذرات به غلظت پکتین وابستگی بیشتری نشان داد که به وابستگی بیشتر پروتئین به حضور پکتین، برای جلوگیری از لخته شدن، نزدیک نقطه خنثی شدن نسبت داده شد.

توزیع اندازه ذرات از نظر کارایی و کیفیت محصول اهمیت ویژه-ای دارد. بنابراین در این پژوهش به منظور بررسی میزان پراکندگی ذرات از پارامتر اسپن استفاده شد. شکل ۴ الف و ب نمودار سه بعدی سطح پاسخ، اثر متقابل کازئینات سدیم - pH و پکتین - pH بر توزیع اندازه ذرات را نشان می‌دهد. با توجه به شکل شاهد هستیم که کازئینات سدیم بر توزیع اندازه ذرات مؤثر بوده و افزایش غلظت آن از ۰/۵٪ به ۱٪ مقدار اسپن را کاهش داد و افزایش بیشتر آن تا ۱/۵٪ میزان پراکندگی را تا حدی زیادتر کرد. با توجه به pH محیط، غلظت پکتین نیز بر توزیع اندازه ذرات مؤثر بوده و با توجه به شکل، کمترین میزان پراکندگی در pH = ۴/۱، پکتین ۰/۴۵٪ کازئینات سدیم ۱٪ مشاهده شد.

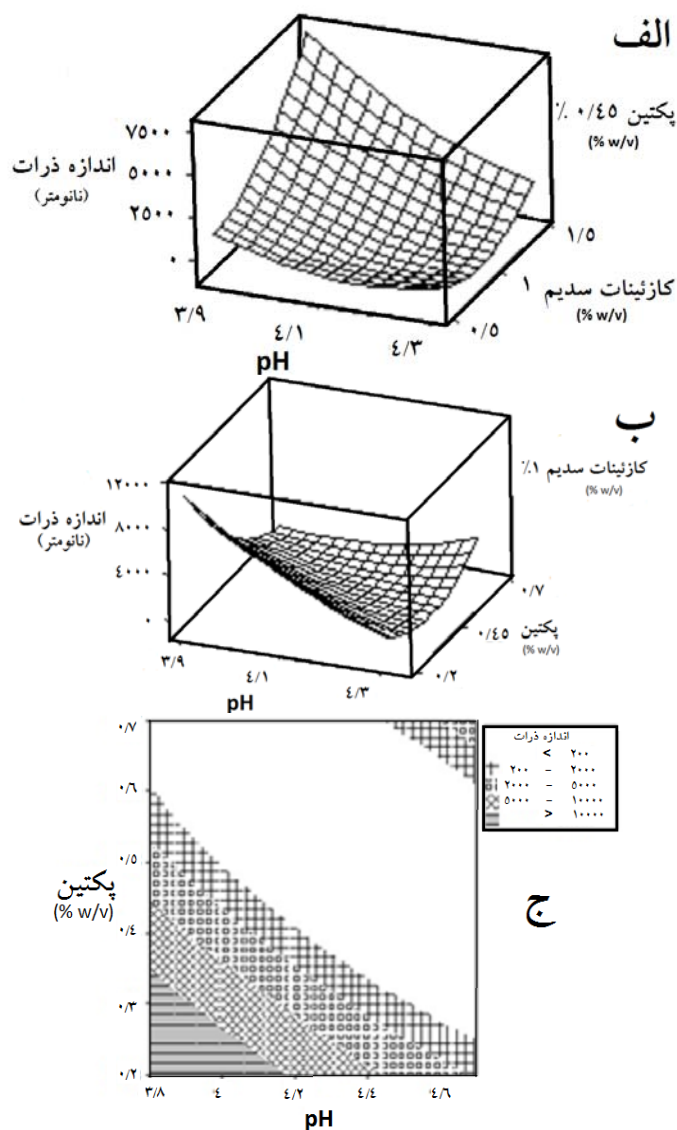
رسوب

به منظور بررسی میزان رسوب و توده‌ای شدن ترکیبات، نمونه های کمپلکس در pHهای مختلف و نسبت‌های مختلف بیوپلیمری به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط نگهداری شدند.

بتا لاکتوگلوبولین، تقریباً در حدود ۳۰۰ نانومتر ثابت باقی می‌ماند. همچنین، در مورد محلول‌های کاراگینان-بتا لاکتوگلوبولین، کاهش یکباره اندازه ذرات در محدوده pH ۴/۷ تا ۷ مشاهده می‌شود و بطور کلی سیستم کاراگینان-بتا لاکتوگلوبولین به تغییرات pH حساس‌تر و اندازه ذرات در تمام pHها بزرگ‌تر از سیستم پکتین-بتا لاکتوگلوبولین بود بطوریکه در pH ۴/۷۵، اندازه ذرات سیستم پکتین-بتا لاکتوگلوبولین حدود ۲۰۰ تا ۳۰۰ نانومتر و سیستم کاراگینان-بتا لاکتوگلوبولین حدود ۷۰۰ نانومتر بود. همچنین مقادیر شاخص چند پختی (PDI) برای سیستم کاراگینان بالاتر از سیستم-های حاوی پکتین بود. تحقیقات Ye و همکاران (۲۰۰۶) بر روی نانوکمپلکس کازئینات صمغ عربی نشان داد که در نسبت ۰/۱٪ به ۰/۱٪ دو بیوپلیمر و در pH بین ۵/۴ و ۴/۲، اندازه ذرات در حدود ۱۱۵ نانومتر ثابت باقی می‌ماند و خارج از این محدوده pH، افزایش می‌یابد.

علاوه بر اثر بار سطحی، رعایت نسبت مناسب بین کازئینات سدیم و پکتین، سیستم را از پدیده‌های توده‌ای شدن ناشی از تشکیل پل و توده‌ای شدن ناشی از تهی شدن در امان نگه می‌دارد. در مقادیر بالای کازئینات سدیم ۱/۵٪، برای دسترسی به کمپلکس‌هایی با اندازه نانو، مقدار بیشتری از پکتین نیاز می‌باشد تا بتواند سطح کازئین را به طور کامل بپوشاند و از تجمع و رسوب آن جلوگیری کند. برعکس در غلظت‌های کم کازئین، به پکتین کمتری برای ایجاد پایداری و تولید ذرات ریزتر احتیاج است. در صورتیکه کازئین به خوبی توسط پکتین پوشیده نشود در pHهای زیر نقطه ایزوالکتریک تجمع می‌یابد. زیرا در این محیط، بار سطحی پروتئین‌های آزاد (بدون پوشش پلی-ساکاریدی) توسط یون‌های موجود در محیط خنثی شده و سیستم ناپایداری را تشکیل می‌دهد که در نهایت منجر به دوفاز شدن سیستم می‌شود (Marozienne et al., 2000; Syrbe et al., 1998).

شکل ۳ ب، اثر متقابل پکتین - pH را به عنوان تابعی از اندازه ذرات نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود در غلظت ۰/۴۵ درصد پکتین، حداقل اندازه ذرات مشاهده می‌شود و خارج از این محدوده اندازه ذرات افزایش می‌یابد. در غلظت ۰/۲٪ پکتین با کاهش pH از ۴/۳ به ۳/۹، افزایش در اندازه ذرات مشاهده شد و این مقدار از ۶۳۹ نانومتر به ۱۲۳۰۳ نانومتر رسید. اما در غلظت‌های بالای پکتین (۰/۷) با تغییر pH اندازه ذرات تغییرات کمی داشت. این مقدار برای pH = ۴/۳ برابر با ۷۹۳ نانومتر و برای pH = ۳/۹، ۳۸۰ نانومتر بدست آمد. نتایج بدست آمده نشان داد که pH در مقادیر کم پکتین نقش مهم‌تری را ایفا می‌کند، زیرا در این شرایط کاهش مقادیر جزئی در چگالی بار منفی پکتین منجر به ایجاد برهمکنش نامناسب با کازئین می‌شود. اما در مقادیر بالاتر پکتین، حتی در pH بسیار پایین هم، با توجه به غلظت بالای پکتین، مقدار بار منفی سطحی به اندازه‌ای زیاد است که می‌تواند با کازئین وارد برهمکنش شده و از توده‌ای شدن آن جلوگیری کند. نمودار دو بعدی شکل ۳ ج به وضوح نشان می‌دهد که



شکل ۳- نمودار اثر متقابل الف: کازئینات سدیم - pH - اندازه ذرات، ب: پکتین - pH - اندازه ذرات و ج: نمودار دو بعدی اثر متقابل پکتین - pH بر اندازه ذرات

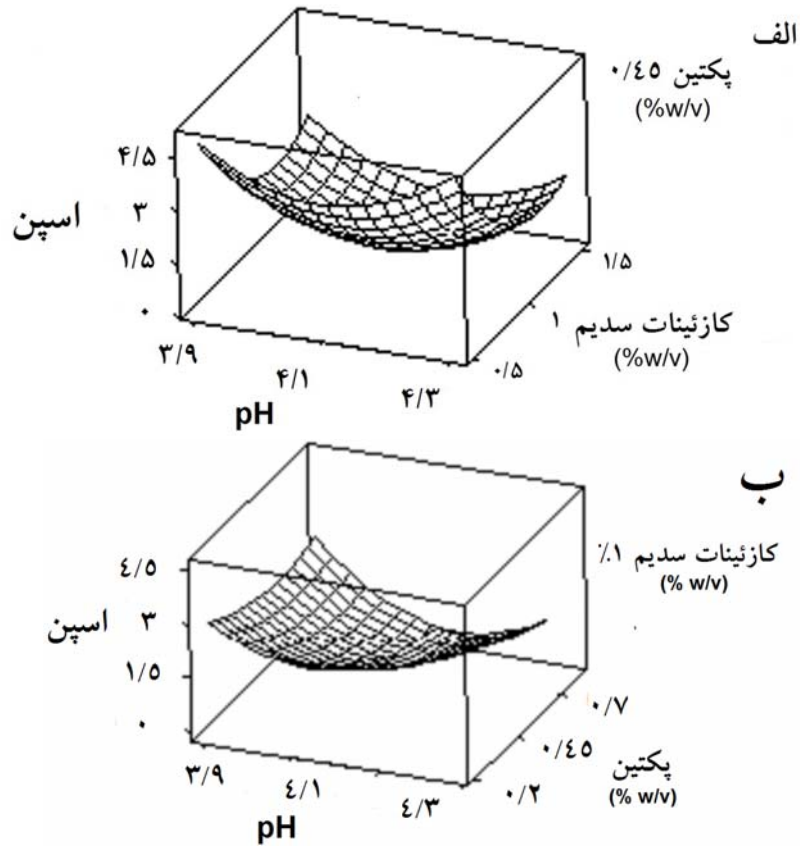
دمای محیط نگهداری شدند و پس از آن از نظر میزان رسوب بررسی شدند. با توجه به شکل ۵، میزان رسوب تشکیل شده در آن‌ها بسیار کم و در حدود ۱ میلی‌متر مشاهده شد و کمترین حالت مربوط به نمونه b بود. آنالیز اندازه ذرات این سه نمونه پس از گذشت زمان مورد نظر، افزایش کمی نشان داد.

به منظور ارزیابی شکل کمپلکس‌های تشکیل شده، تصویر میکروسکوپ الکترونی از نمونه بهینه (۰/۴۵ پکتین، ۱٪ کازئینات سدیم و $\text{pH}=4/1$) تهیه شد. تصویر مربوطه، وجود ذرات تقریباً کروی تا بیضی را نشان داد. این ذرات دارای اندازه حدود ۷۰ نانومتر بودند که نتایج حاصل از اندازه‌گیری ذرات را تایید می‌کند. سطح ذرات کمی

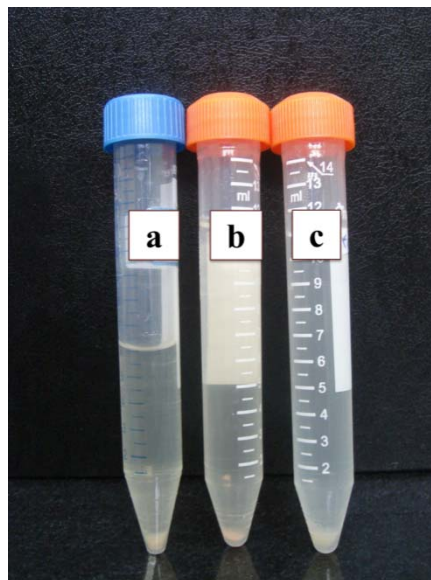
در pHهای کمتر از ۴ و نزدیک به pka پکتین، ذرات به سرعت تشکیل لخته و رسوب دادند. زیرا در این شرایط میزان بار منفی پکتین به شدت کاهش یافته و نمی‌تواند نیروی دافعه قوی بین ذرات کمپلکس برقرار کند. در نتیجه ذرات به شکل توده درآمده و رسوب می‌کنند.

در pHهای مابین ۴ و ۵ بسته به نسبت بین بیوپلیمرها، میزان رسوب تشکیل شده متفاوت بود و با افزایش نسبت پکتین - کازئین، مقاومت در برابر رسوب در pHهای اسیدی بیشتر شد. از بین تمام نمونه‌های بررسی شده، سه نمونه a، b و c از نظر تشکیل رسوب پایداری بیشتری را نشان دادند. این سه نمونه به مدت ۱۳ ماه در

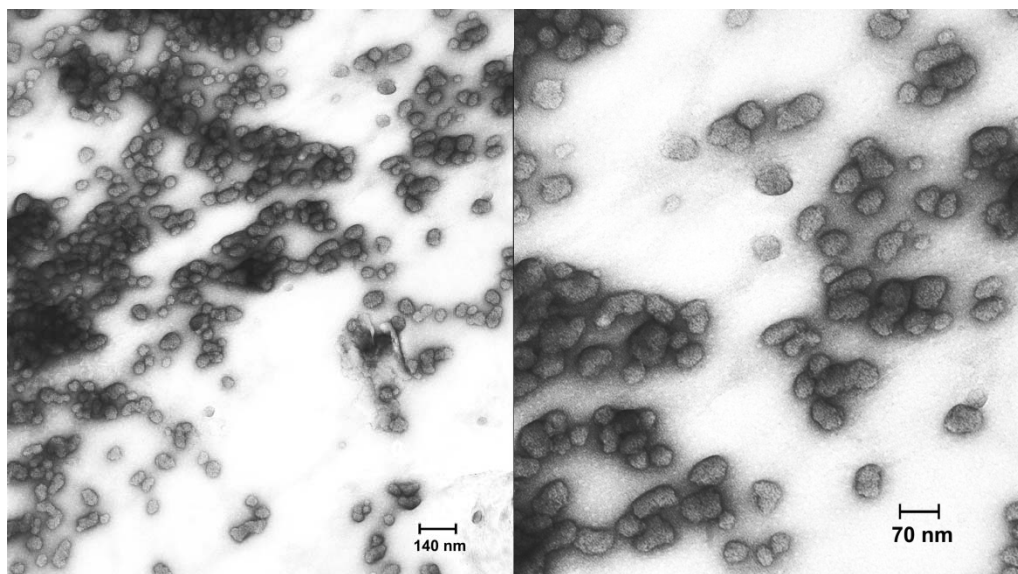
زبر و خشن به نظر می‌رسند که احتمالاً به دلیل وجود رشته‌های پکتین در سطح کمپلکس می‌باشد. برخی از ذرات بصورت تنها و برخی نیز بصورت توده‌های لوبیایی شکل مشاهده می‌شوند.



شکل ۴- نمودار اثر متقابل الف: کازئینات سدیم - pH و ب: پکتین - pH بر توزیع اندازه ذرات



شکل ۵ - میزان رسوب کمپلکس کازئین - پکتین (۱٪ - ۰/۴۵٪) در pH های a: pH=۴/۳, b: pH=۴/۱ و c: pH=۳/۹
 تصاویر میکروسکوپ الکترونی



شکل ۶ - تصاویر میکروسکوپ الکترونی کمپلکس پکتین ۰/۴۵٪ - کازئینات ۱٪ و pH = ۴/۱

ویژگیهای رئولوژیک پایا

درآزمون رئولوژیکی پایا، رفتار جریان غلظت‌های مختلف دو نوع بیوپلیمر پکتین با سه غلظت ۰/۲٪، ۰/۴۵٪ و ۰/۷٪ و کازئینات سدیم با سه غلظت متفاوت ۰/۵٪، ۱٪ و ۱/۵٪ در pH طبیعی محلول و همچنین کمپلکس‌های تشکیل شده در غلظت‌های مختلف این دو بیوپلیمر در pH = ۴/۱ مورد ارزیابی قرار گرفت.

شکل ۷ اثر غلظت‌های مختلف پکتین و کازئین و همچنین کمپلکس حاصل از آن‌ها را بر ویسکوزیته در آهنگ برشی مختلف نشان می‌دهد. در سرعت‌های برشی پایین، شکسته شدن پیوندهای ضعیف (هیدروژنی و آبگریز) منجر به ایجاد افت اولیه در مقدار ویسکوزیته می‌شود. همانطور که در شکل مشاهده می‌شود، بین تنش برشی و سرعت برشی غلظت‌های مختلف پکتین، کازئین و همچنین کمپلکس حاصل از آن‌ها رابطه نسبتاً خطی وجود دارد و این رفتار نشان می‌دهد که محلول‌ها دارای ساده‌ترین رفتار جریانی، یعنی رفتار نزدیک به نیوتنی هستند. در این سیالات، شیب خط نمودار تنش برشی - سرعت برشی، ویسکوزیته را نشان می‌دهد بطوریکه با افزایش ویسکوزیته محلول، شیب منحنی افزایش می‌یابد. همچنین، نمودارهای ویسکوزیته-سرعت برشی نشان داد که ویسکوزیته به سرعت برشی وابسته نیست و با افزایش سرعت برشی، ویسکوزیته در تمامی سرعت‌های اعمال شده ثابت می‌ماند (شکل ۸). با توجه به شکل، مشاهده می‌شود که پکتین در تمامی غلظت‌ها نسبت به کازئین دارای شیب و ویسکوزیته بیشتری است و از بین درصدهای مختلف پکتین، غلظت ۰/۷٪ پکتین بالاترین ویسکوزیته را نشان می‌دهد. پکتین به دلیل داشتن گروه‌های آلدوست فراوان، به میزان زیادی آب جذب می‌کند و افزایش درصد پکتین سبب افزایش تعداد گروه‌های آلدوست و جذب بیشتر آب می‌شود. افزایش مقدار زیاد پکتین در

محلول، موجب می‌شود تا رشته‌های مولکولی پکتین در مناطقی گیر افتاده و همچنین توسط بر همکنش‌های بین رشته‌ای، از نوع هیدروژنی و آبگریز به یکدیگر متصل شده و حالتی را ایجاد کند که از نظر حالیت، در محدوده بین انحلال کامل و رسوب قرار گیرند. این برهمکنش‌ها در نهایت منجر به افزایش یکباره ویسکوزیته در محلول مورد نظر می‌شود. همانطور که می‌دانیم در دمای ثابت رابطه مستقیم غیرخطی بین غلظت مواد محلول و ویسکوزیته وجود دارد و با افزایش غلظت مواد، ویسکوزیته افزایش می‌یابد. بررسی‌های انجام شده توسط Kaya و همکاران (۲۰۰۱) هم نشان داد که ویسکوزیته محلول آبی کربوکسی متیل سلولز به شدت تحت تأثیر غلظت آن می‌باشد و با افزایش غلظت، افزایش شدیدی در مقدار ویسکوزیته مشاهده می‌شود. همچنین تحقیقات انجام شده توسط عباسی و همکاران (۱۳۸۴) نشان داد که ویسکوزیته محلول آبی کتیرا، تحت تأثیر غلظت آن قرار می‌گیرد و با دو برابر کردن غلظت کتیرا، میزان ویسکوزیته ۹ - ۶ برابر می‌شود. با توجه به نیوتنی بودن رفتار محلول‌های دو بیوپلیمر در غلظت‌های مختلف انتخاب شده، می‌توان به این نتیجه رسید که محلول‌های فوق، محلول‌های رقیق بوده و هنوز به غلظت و کسر حجمی بحرانی نرسیده اند تا شاهد افزایش یکباره ویسکوزیته و ظهور رفتار سودوپلاستیک (روان شونده با برش) باشیم.

در نمودار ویسکوزیته - سرعت برشی نمونه‌های کمپلکس مشاهده می‌شود که در تمامی نمونه‌های کمپلکس، محلول‌های حاوی ۰/۷٪ پکتین، دارای ویسکوزیته بالاتری هستند و با کاهش غلظت پکتین، مقدار ویسکوزیته نمونه کمپلکس کاهش می‌یابد. به نظر می‌رسد که افزایش غلظت پکتین بیشتر با اثر بر ویسکوزیته فاز پیوسته، بر ویسکوزیته کلی سیستم کلئیدی مؤثر است تا اثر بر اندازه ذرات فاز پراکنده. با افزایش اندازه ذرات، انتظار می‌رود که اتلاف انرژی

روان شونده با برش، جایگزین رفتار نیوتنی می‌شود. با توجه به جدول مشاهده می‌شود که نمونه‌های کمپلکس حاوی ۰/۵٪ کازئینات سدیم و نمونه ۱/۵٪ کازئینات سدیم و ۰/۲٪ پکتین، دارای کمترین مقدار شاخص جریان و دارای رفتار روان شوندگی ضعیف برای محلول‌های رقیق یا رفتار شبه نیوتنی هستند و می‌توان گفت که در این نمونه‌ها مقادیر ضریب قوام نزدیک به ویسکوزیته می‌باشد.

این موضوع نشان می‌دهد که برهمکنش بین پکتین و کازئینات، موجب افزایش کسر حجمی مؤثر ذرات و رسیدن به مقدار بحرانی و در نتیجه جایگزینی رفتار روان شونده با برش با رفتار نیوتنی می‌شود. ولی سایر نمونه‌های کمپلکس، بر رفتار رئولوژیکی سیستم بی‌تأثیر بوده و برای استفاده در نوشیدنی‌های رقیق مناسب می‌باشند. هاشمی-نیا و همکاران (۱۳۹۰) در گزارشی اثر ایجاد برهمکنش بین پروتئین-های شیر با بار مثبت و ژلان بر اندیس قوام و شاخص جریان را مورد بررسی قرار دادند و بیان کردند که این برهمکنش سبب افزایش شاخص قوام و ویسکوزیته در تنش برشی ثابت و کاهش اندیس جریان می‌شود.

pH، دما، ظرفیت اتصال به مولکول‌های آب و غلظت محلول از جمله عواملی هستند که می‌توانند بر ضریب قوام مؤثر باشند. Wanchoo و همکاران (۱۹۹۶) گزارش کردند که شاخص جریان وابستگی شدیدی به غلظت محلول و دما دارد در صورتیکه میزان وابستگی ضریب قوام به این دو عامل کمتر است.

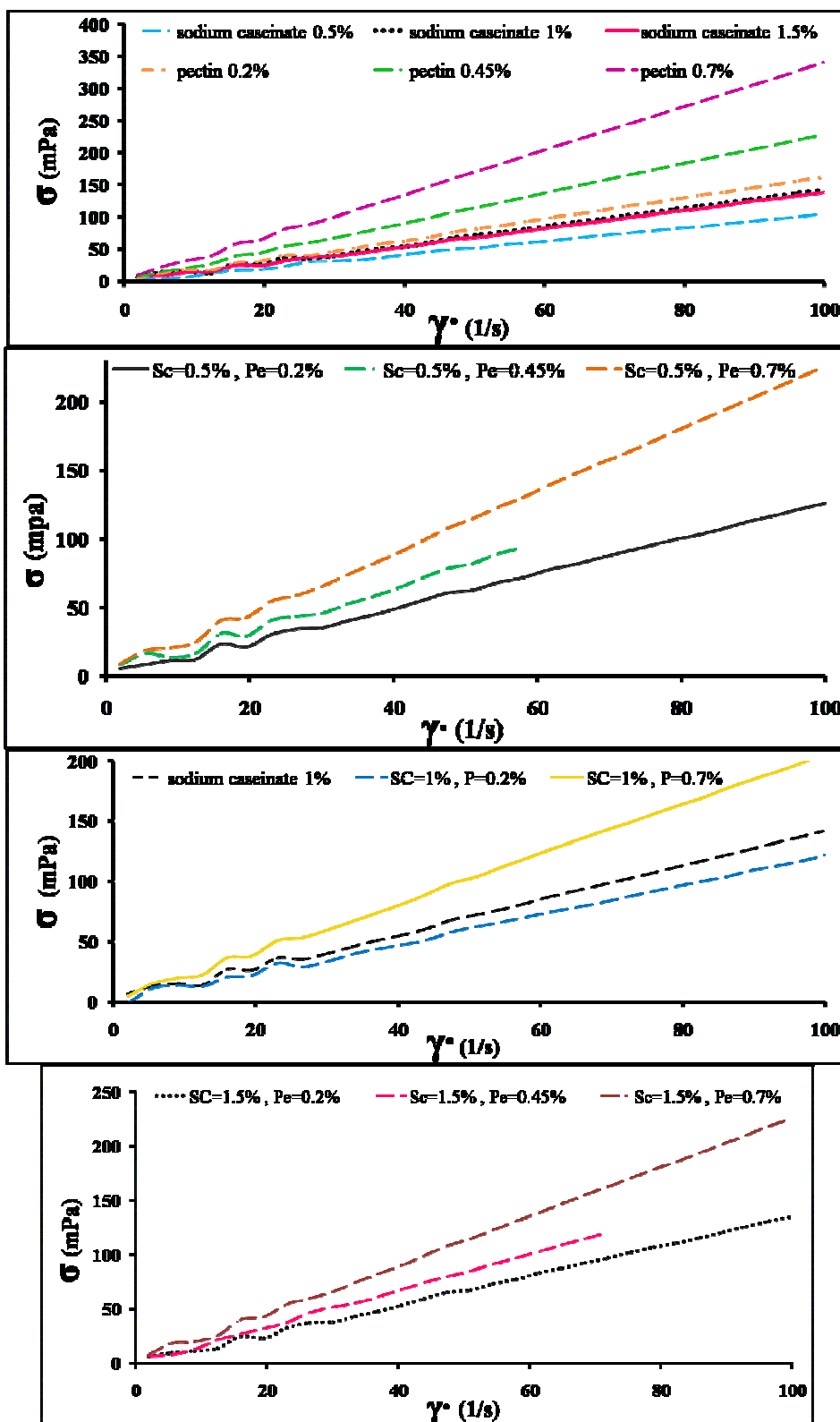
نتیجه گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که کمپلکس بین کازئینات و پکتین در زیر نقطه ایزوالکتریک کازئینات و با برقراری پیوندهای الکتروستاتیک ایجاد شد. طیف سنجی فرو سرخ تشکیل پیوند جدید آمیدی حاصل از برهمکنش‌های بین گروه کربوکسیل پکتین و گروه آمینی کازئین را نشان داد. مقادیر زتا پتانسیل محلول کازئینات-پکتین بین مقادیر آن در محلول‌های خالص کازئینات و پکتین خالص قرار نداشت و بار الکتریکی منفی در نمونه کمپلکس، بسیار بیشتر از نمونه‌های خالص کازئین و پکتین بود و با توجه به مقادیر بالای منفی پتانسیل زتا در محلول کمپلکس در $pH=4/1$ ، انتظار می‌رود به علت وجود نیروی دافعه الکترواستاتیک بالاتر، پایداری محلول‌های آن بیشتر از محلول کازئیناتی خالص باشد. با توجه به نتایج حاصل از اندازه ذرات مشخص شد که اندازه ذرات علاوه بر نسبت بین بیوپلیمرها به شدت به pH محیط وابسته است و کوچکترین اندازه ذرات (۸۰ نانومتر) در $pH=4/1$ و غلظت‌های ۰/۴۵٪ و ۱٪ به ترتیب برای پکتین و کازئینات حاصل شد. مشاهدات مربوط به رسوب، بیشترین پایداری و کمترین میزان رسوب را برای نمونه پهنه در $pH=4/1$ نشان داد. اندازه‌گیری‌های رئولوژیکی نشان داد که نمونه‌های کمپلکس، برخلاف محلول‌های خالص کازئین و پکتین (رفتار نیوتنی)، رفتار روان شونده با برش را نشان می‌دهند.

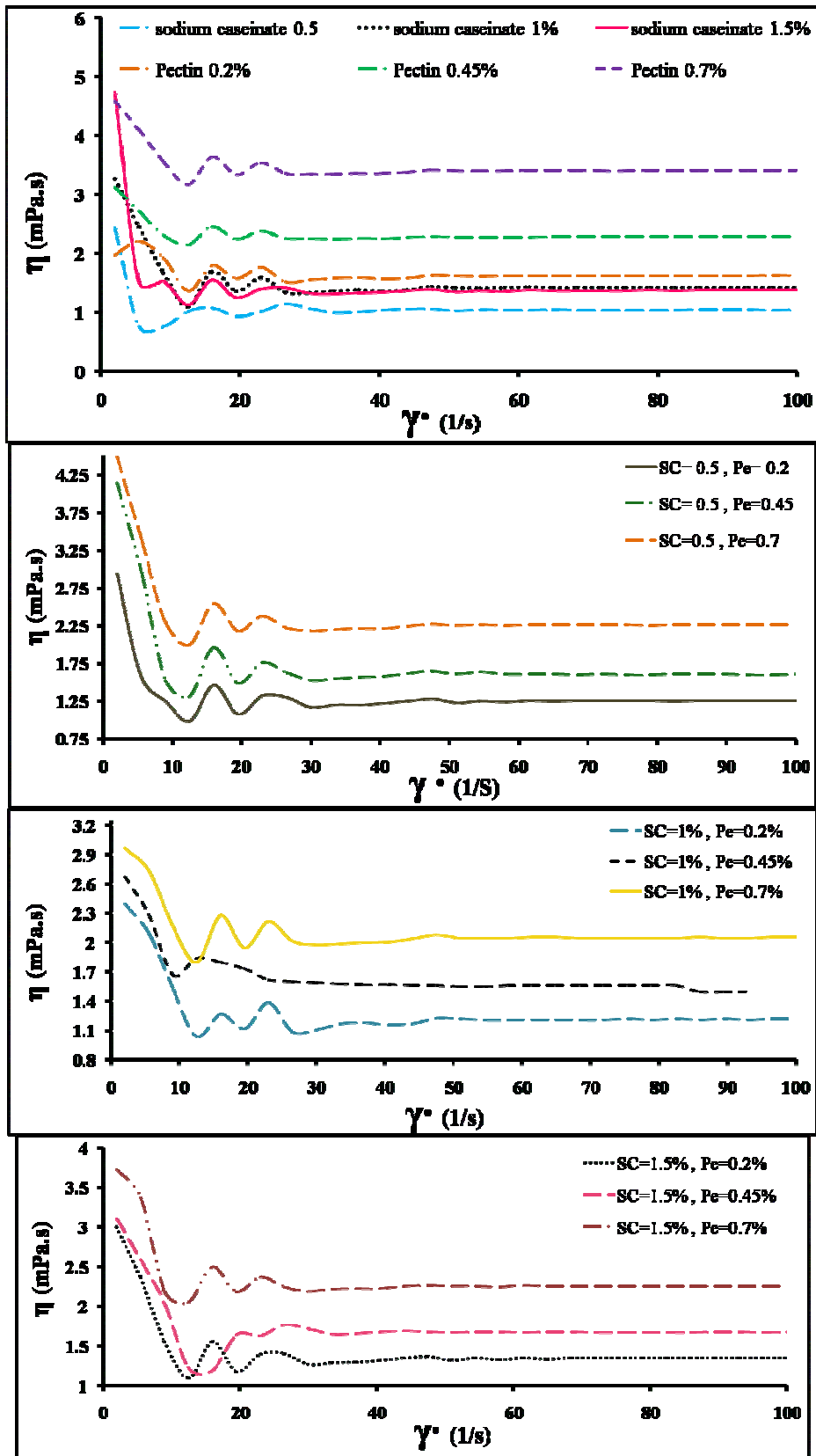
حاصل از اصطکاک، که در اثر اعمال نیروی برشی ایجاد می‌شود، زیاد شده و در نتیجه ویسکوزیته مقدار بیشتری را نشان دهد. این اثر برای کمپلکس‌های حاوی کازئینات سدیم ۰/۵٪ و پکتین ۰/۲ - ۰/۷ صحیح می‌باشد زیرا با افزایش پکتین در این شرایط، اندازه ذرات از ۱۲۰ به ۲۱۰۰ نانومتر افزایش نشان داد. اما در نمونه‌های کمپلکس حاوی کازئینات سدیم ۱/۵٪ و پکتین ۰/۲ - ۰/۷ درصد، نتیجه عکس مشاهده شد. در این نمونه افزایش غلظت پکتین از ۰/۲ به ۰/۷، اندازه ذرات را از ۱۲۰۲۵ به ۱۱۹ نانومتر کاهش داد ولی میزان ویسکوزیته آن افزایش یافت که به اثر پکتین بر ویسکوزیته فاز پیوسته می‌تواند نسبت داده شود.

عامل دیگری که باعث افزایش ویسکوزیته می‌شود pH محیط می‌باشد. pH بر روی بیوپلیمرهای باردار از جمله پکتین و کازئین که دارای بار الکتریکی در سطح هستند مؤثر است. پکتین به دلیل داشتن گروه کربوکسیل باردار بر سطح خود، تحت تأثیر اسیدیته محیط قرار می‌گیرد و در محیط اسیدی بار منفی خود را تا حدودی از دست می‌دهد. کاهش دافعه الکتروستاتیک ناشی از کاهش بارهای منفی سبب نزدیک شدن زنجیره‌ها به هم شده و منجر به کاهش ویسکوزیته در محیط اسیدی می‌شود. با توجه به اینکه در این سیستم، pH تمامی محلول‌ها ثابت در نظر گرفته شده است، می‌توان میزان بار سطحی را به غلظت پلی‌ساکارید ارتباط داد. به این ترتیب که با افزایش غلظت پلی‌ساکارید در pH ثابت، میزان بار سطحی کل و در نتیجه دافعه الکتروستاتیک افزایش می‌یابد. pH همچنین می‌تواند روی خصوصیات کنفورماسیونی پکتین اثر گذاشته و سبب ایجاد ساختار قوی‌تر در آن شود. در گزارشی که توسط Medina-Torres و همکاران (۲۰۰۰) انجام شد اثر pH را بر روی ویسکوزیته ظاهری *Ficusindica Opuntia* بررسی کردند و بیان نمودند که چنین تغییراتی مربوط به تغییرات کنفورماسیونی مولکول می‌باشد.

یکی از مدل‌هایی که برای تفسیر رفتار رئولوژیکی مورد استفاده قرار می‌گیرد، مدل قانون توان می‌باشد. در جدول ۳ مقادیر شاخص رفتار جریان (n) و ضریب قوام (k) بدست آمده از مدل قانون توان و همچنین ضریب تبیین R^2 برای تمام نمونه‌های آزمایشی با درصد‌های مختلف نشان داده شده است. ضریب تبیین R^2 برای اکثر نمونه‌های مورد آزمون بالای ۹۸ درصد بوده که نشان دهنده مناسب بودن مدل قانون توان برای توصیف خصوصیات جریانی کازئین و پکتین می‌باشد. در این رابطه هر چه n به عدد یک نزدیک‌تر باشد، نشانه تمایل سیال به رفتارهای نیوتنی و هر چه به صفر نزدیک‌تر باشد، نشانه تمایل سیال به رفتار سودوپلاستیک است. با توجه به جدول ۴ مشاهده می‌شود که مقادیر شاخص رفتار جریانی برای اکثر نمونه‌ها، بالاتر از ۰/۹ است که دلالت بر رفتار نیوتنی دارد. همچنین مشاهده شد که افزایش غلظت پکتین، ضریب قوام را افزایش داده و بر شاخص جریان تقریباً بی‌اثر است. در حالیکه افزایش غلظت کازئین به تنهایی در محلول، سبب کاهش در شاخص جریان شده و رفتار



شکل ۷- نمودار تنش برشی - سرعت برشی برای نمونه‌های حاوی غلظت‌های متفاوت کازئینات سدیم (۰/۵٪، ۱٪، ۱/۵٪) و پکتین (۰/۲٪، ۰/۴۵٪، ۰/۷٪) و کمپلکس بین آن‌ها در $\text{pH} = 4/1$



شکل ۸- نمودار ویسکوزیته - سرعت برشی برای نمونه‌های حاوی غلظت‌های مختلف کازئینات سدیم (۰/۵٪، ۱٪ و ۱/۵٪) و پکتین (۰/۲٪، ۰/۴۵٪ و ۰/۷٪) و کمپلکس بین آن‌ها در pH = ۴/۱

جدول ۴- پارامترهای محاسبه شده مربوط به مدل قانون توان برای نمونه‌ها، شامل شاخص رفتار جریان، ضریب قوام و R^2

R^2	ضریب قوام (K, Pa.s)	شاخص رفتار جریان (n)	پکتین (%)	کازئینات سدیم (%)
۰/۹۶۲۱	۱/۲۸۳۲	۰/۹۴۴۸	-	۰/۵
۰/۹۷	۱/۷۹۳۹	۰/۸۵۳۶	-	۱
۰/۹۴۷۴	۲/۵۱۳۶	۰/۸۴۵۵	-	۱/۵
۰/۹۹۳۴	۲/۰۰۹۵	۰/۹۴۵۳	۰/۲	-
۰/۹۹۶۹	۲/۸۱	۰/۹۴۸۶	۰/۴۵	-
۰/۹۹۷۱	۴/۱۷۵۴	۰/۹۴۸۴	۰/۷	-
۰/۹۷۱۴	۱/۹۱۶۹	۰/۸۹۰۷	۰/۲	۰/۵
۰/۹۳۵۲	۳/۵۸۵۲	۰/۷۷۰۷	۰/۴۵	۰/۵
۰/۹۸۳۵	۱/۲۸۳۲	۰/۸۸۶۵	۰/۷	۰/۵
۰/۹۷۶	۱/۶۶۹۱	۰/۹۱۸۷	۰/۲	۱
۰/۹۸۶۷	۱/۷۹۳۹	۰/۹۶۴۴	۰/۴۵	۱
۰/۹۹۵۳	۲/۴۴۹	۰/۹۵۵۵	۰/۷	۱
۰/۹۷۴۲	۲/۰۰۲۶	۰/۸۹۸	۰/۲	۱/۵
۰/۹۸۳۸	۲/۰۳۰۹	۰/۹۵۰۲	۰/۴۵	۱/۵
۰/۹۸۹۲	۳/۲۰۵۵	۰/۹۱۱۸	۰/۷	۱/۵

بیوتکنولوژی مرکز تحقیقات دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز،
تشکر و قدر دانی می شود.

سپاسگزاری

بدین وسیله از مرکز تحقیقات و توسعه شرکت تکدانه به دلیل پشتیبانی فنی در انجام آزمایش‌های رئولوژیکی و مرکز تحقیقات

منابع

- عباسی، س. و رحیمی، س.، ۱۳۸۴، بررسی تأثیر غلظت، دما و پ‌هاش و سرعت چرخشی روی رفتار جریان محلول صمغ کتیرای ایرانی، مجله علوم و صنایع غذایی ایران، ۲، ۴۱-۲۹.
- قنبرزاده، ب.، ۱۳۸۸، مبانی رئولوژی مواد و بیوپلیمرهای غذایی، انتشارات دانشگاه تهران.
- هاشمی‌نیا، م.، ابراهیم زاده موسوی، م. ع.، احسانی، م. ر. و دهقانیا، ج.، ۱۳۹۰، تأثیر افزودن هیدروکلئید ژلان روی ویژگی‌های رئولوژیکی و پایدارسازی دوغ فیبردار، نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی، ۲۱، ۱۹۳-۱۷۹.
- Anal, A. K., Tobiassen, A., Flanagan, J. & Singh, H., 2008, Preparation and characterization of nanoparticles formed by chitosan-caseinate interactions, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 64, 104-110.
- Bedie, G. K., Turgeon, S. L. & Makhlouf, K., 2008, Formation of native whey protein isolate-low methoxyl pectin complexes as a matrix for hydro-soluble food ingredient entrapment in acidic foods, *Food Hydrocolloids*, 22, 836-844.
- Chanasattru, W., Griffith Jones, O., Decker, E. A. & McClements, D. J., 2009, Impact of cosolvents on formation and properties of biopolymer nanoparticles formed by heat treatment of Beta-lactoglobulin-Pectin complexes, *Food Hydrocolloids*, 23, 2450-2457.
- Chen, L., Remondetto, G. E. & Subirade, M., 2006, Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems, *Trends in Food Science and Technology*, 17, 272-283.
- Des Rieux, A., Fievez, V., Garinot, M., Schneider, Y.J. & Pr at, V., 2006, Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach, *Journal of Controlled Release*, 116, 1-27.
- Filippove, M. P., 1992, Practical infrared spectroscopy of pectic substances, *Food Hydrocolloids*, 6, 115-142.
- Girard, M., Turgeon, S. L. & Gauthier, S. F., 2003, Thermodynamic parameters of beta-lactoglobulin - pectin complexes assessed by isothermal titration calorimetry, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4450-4455.
- Gnanasambandan, R. & Proctor, A., 2000, Determination of pectin degree of esterification by diffuse reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy, *Food Chemistry*, 68, 327-332.
- Grenha, A., Gomes, M. E., Rodrigues, M., Santo, V. E., Mano, J. F., Neves, N. M. & Reis, R. L., 2009, Development of new chitosan/carageenan nanoparticles for drug delivery applications, *Journal of Material Research A*,

92, 1265-1272.

Gu, Y. S., Decker, E. A. & McClements, D. J., 2004, Influence of pH and iota-carrageenan concentration on physicochemical properties and stability of beta-lactoglobulin-stabilized oil-in-water emulsions, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3626–3632.

Honary, S., Maleki, M. & Karimi, M., 2009, The effect of chitosan molecular weight on the properties of alginate/chitosan microparticles containing prednisolone, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 8, 53-61.

Jensen, S., Rolin, C. & Ipsen, R., 2010, Stabilisation of acidified skimmed milk with HM pectin, *Food Hydrocolloids*, 24, 291-9.

Jones, W., Decker, E. A. & McClements, D. J., 2010, Thermal analysis of beta-lactoglobulin complexes with pectins or carrageenan for production of stable biopolymer particles, *Food Hydrocolloids*, 24, 239–248.

Kaya, S. & Tekin, A. R., 2001, The effect of *salep* content on the rheological characteristics of a typical ice-cream mix, *Journal of Food Engineering*, 47, 59-62.

Langer, R. & Peppas, N. A., 2003, Advances in biomaterials, drug delivery, and bionanotechnology, *American Institute of Chemical Engineers*, 49, 299 -306.

Li, P., Dai, Y. N., Zhang, J. P. & Wang, A. Q., 2008, Chitosan- Alginate nanoparticles as a novel drug delivery system for nifedipine, *International Journal of Biomedical Science*, 4, 221-228.

Lucey, J. A., Tamehana, M., Singh, H. & Munro, P. A., 1999, Stability of model acid milk beverage: Effect of pectin concentration, storage temperature and milk heat treatment, *Journal of Texture Studies*, 30,305-18.

Luo, Y., Zhang, B., You, L., Whent, M. & Wang, Q., 2011, Preparation and characterization of zein/chitosan complex for encapsulation of alfa-tocopherol, and its in vitro controlled release study, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*,85,145-152.

Maroziane, A. & de Kruif, C. G., 2000, Interaction of pectin and casein micelles, *Food Hydrocolloids*, 14, 391-394.

Medina-Torres. L., 2000, Rheological properties of the mucilage gum (*Opuntia ficus indica*), *Food Hydrocolloids*, 14, 417-424.

Orona, V. U., Chu, A. R. & Mendoza, J. L., 2010, A novel pectin material: Extraction, Characterization and Gelling Properties, *International Journal of Molecular Science*, 11, 3686-3695.

Pedersen, H. C. A. & Jorgensen, B. B., 1991, Influence of pectin on the stability of casein solutions studied in dependence of varying pH and salt concentration, *Food Hydrocolloids*, 5, 323-328.

Ron, N., Zimet, P. & Livney, Y. D., 2010, Beta-lactoglobulin-polysaccharide complexes as nanovehicles for hydrophobic nutraceuticals in non-fat foods and clear beverages, *International dairy journal*, 20, 686-693.

Santipanichwong, R., Suphantharika, M., Weiss, J. & McClements, D. J., 2008, Core-shell biopolymer nanoparticles produced by electrostatic deposition of beet pectin onto heat-denatured beta-lactoglobulin aggregate, *Journal of Food Science*, 73, 23 – 30.

Sato, M. D. F., Rigoni, D. C., Canteri, M. H. G., Petkowics, C. L. D. O., Nogueira, A. & Wosiacki, G., 2011, Chemical and instrumental characterization of pectin from dried pomace of eleven apple cultivar, *Acta Scientiarum Agronomy*, 33, 383-389.

Schonhoff, M., 2003, Layered polyelectrolyte complexes: Physics of formation and molecular properties, *Journal of Physics: Condensed Matter*, 15, 781–808.

Sejersen, M. T., Salomonsen, T., Ipsen, R., Clark, R., Rolin, C. & Engelsen, S. B., 2007, Zeta potential of pectin-stabilized casein aggregates in acidified milk drinks, *International Dairy Journal*, 17, 302–307.

Surh, J., Decker, E. A. & McClements, D. J., 2006, Influence of pH and pectin type on properties and stability of sodium-caseinate stabilized oil-in-water emulsions, *Food Hydrocolloids*, 20, 607–618.

Syrbe, A., Bauer, W. J. & Klostermeyer, H., 1998, Polymer science concepts in dairy system: An overview of milk protein and food hydrocolloid interaction, *International Dairy Journal*, 8, 179–193.

Thakur, B. R., Singh, R. K. & Handa, A. K., 1997, Chemistry and uses of pectin-a review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37, 47–73.

Tuinier, R., Rolin, C. & de Kruif, C. G., 2002, Electrosorption of pectin onto casein micelles, *Biomacromolecules*, 3, 632– 638.

Wanchoo, R. K., Sharma, S. K. & Bansal, R., 1996, Rheological parameters of some water-soluble polymers, *Polymer Materials*, 13, 49- 55.

Ye, A., Flanagan, J. & Singh, H., 2006, Formation of stable nanoparticles via electrostatic complexation between sodium caseinate and gum arabic, *Biopolymers*, 82, 121-133.

Ye, A., 2008, Complexation between milk proteins and polysaccharides via electrostatic interaction: principles and

applications – a review, *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 406–415.

Zimet, P. & Livney, Y. D., 2009, Beta-lactoglobulin and its nanocomplexes with pectin as vehicles for u-3 polyunsaturated fatty acids, *Food Hydrocolloids*, 23, 1120–1126.