

بررسی برخی عوامل مؤثر بر ویژگی های امولسیون لیمونین در آب تثبیت شده با کازئینات

سدیم

رسول کدخدایی^۱ - مسعود نجف نجفی^{۲*}

تاریخ دریافت: ۹۰/۳/۰۷

تاریخ پذیرش: ۹۰/۸/۰۷

چکیده

تأثیر pH، غلظت های مختلف Tween 80 و یون کلسیم بر پایداری امولسیون لیمونین در آب تثبیت شده با غلظت های مختلف کازئینات سدیم مورد مطالعه قرار گرفت. به این منظور نمونه های امولسیون روغن در آب حاوی ۱۰٪ (وزنی/وزنی) لیمونین بازای ماده دیواره در محلول آبی دارای ۲، ۵ و ۱۰٪ کازئینات سدیم با کمک امواج فراصوت تهیه شد و خصوصیات آن ها نظیر توزیع اندازه قطرات، میانگین قطر و سطح مخصوص قطرات و عدد اسپان مورد سنجش قرار گرفت. نتایج نشان داد که امولسیون تثبیت شده با ۱۰٪ کازئینات سدیم از قطرات کوچک تر با عدد اسپان های کمتر و منحنی توزیع اندازه قطرات باریک تر و تیزتر نسبت به غلظت های پایین تر برخوردار بودند. از سوی دیگر با افزایش غلظت Tween 80 تا حد ۱/۵٪ اندازه قطرات و عدد اسپان کاهش یافت، اما بعد از آن افزایش نشان داد. همچنین، pH و یون کلسیم تأثیر معنی داری بر پایداری امولسیون ها داشتند.

واژه‌های کلیدی: کازئینات سدیم، لیمونین، پایداری امولسیون، Tween 80، یون کلسیم

مقدمه

گوناگونی از ترکیبات، وزن مولکولی بالا و انعطاف پذیری زنجیره مولکولی، خصوصیات کارکردی مطلوبی نظیر حلالیت، ویسکوزیته و امولسیون کنندگی را پیدا می کنند لذا به طور گسترده ای برای تهیه، بهبود پایداری و ایجاد ویژگی های فیزیکوشیمیایی مطلوب در امولسیون ها مورد استفاده قرار می گیرند (McClements et al., 2004). زمانی که ترکیبی از آب و روغن (امولسیون روغن در آب) به همراه مولکول های پروتئینی تحت فرایند همگن سازی قرار می گیرند، پروتئین ها جذب قطرات تازه تشکیل شده حاصل از فرایند گردیده و با تشکیل یک لایه محافظ موجب کاهش تنش سطحی بین مولکول های آب و روغن می شوند و از به هم چسبیدن و تجمع قطرات جلوگیری می کنند (McClements et al., 2004; Dalglish et al., 2004). کازئینات سدیم یکی از این پروتئین ها می باشد که به عنوان افزودنی کاربرد گسترده ای در صنایع غذایی دارد. کازئین ها به سرعت جذب سطح مشترک روغن-آب در هنگام تهیه امولسیون می شوند و به لحاظ دارا بودن نیروهای قوی الکتروستاتیک و استریک، سبب پایداری امولسیون می گردند (Dickinson et al., 1998). تاکنون در مطالعات مختلف از غلظت های متفاوتی از کازئینات سدیم استفاده شده است. در نسبت های

امولسیون ها سامانه هایی هستند که از دو مایع غیر قابل امتزاج تشکیل شده اند، به طوری که یک مایع به صورت قطرات کروی شکل بسیار ریز در مایع دیگر پراکنده شده است (Ferry Berg et al., 1997). سامانه های امولسیونی ممکن است به دو شکل ساده روغن در آب (O/W) و یا آب در روغن (W/O) و یا این که به صورت چندگانه روغن در آب در روغن (O/W/O) و یا آب در روغن در آب (W/O/W) دیده شوند (Gartti et al., 2004). امولسیون ها از نظر ترمودینامیکی، ناپایدار می باشند. از این رو، معمولاً از ترکیباتی نظیر پروتئین ها برای افزایش ثبات و پایداری آن ها استفاده می شود (Dickinson et al., 2003; Dickinson et al., 1997). پروتئین ها با دارا بودن گروه های عاملی مختلف، خصوصیات آمفی فیلک، توانایی خود تجمعی و خود ساختارسازی و برهم کنش با انواع

۱- استادیار گروه صنایع غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی خراسان رضوی
۲- استادیار مؤسسه آموزش عالی علمی کاربردی وزارت جهاد کشاورزی و گروه صنایع غذایی مرکز آموزش عالی جهاد کشاورزی خراسان رضوی
* نویسنده مسئول: (Email: Masoudnajafi@yahoo.com)

امولسیفایر Tween 80 از شرکت سیگما آلدریج خریداری گردید. لیمونین با درجه خلوص ۹۵٪ از شرکت مرک تهیه شد. سایر مواد شیمیایی مورد استفاده با درجه خلوص بالا (۹۹/۹ درصد) از شرکت مرک آلمان فراهم شدند. برای تهیه کلیه محلول ها از آب دیونیزه استفاده گردید.

تهیه سوسپانسیون های کلونیدی

نسبت های وزنی مناسبی از کارژینات سدیم به آب دیونیزه اضافه شد و سپس با استفاده از یک همزن مغناطیسی به مدت یک ساعت مخلوط گردید تا محلول های ۲، ۵ و ۱۰ درصد (وزنی/وزنی) (pH=7) تهیه شود. پس از آن سوسپانسیون های کلونیدی مذکور به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شدند تا حداکثر جذب آب انجام پذیرد.

تهیه امولسیون

لیمونین به نسبت ۱۰٪ ماده خشک کلیه محلول ها استفاده شد. Tween 80 به عنوان امولسیفایر در غلظت های ۰، ۵، ۱۰، ۱/۵ و ۲٪ وزن کل اضافه گردید. عملیات هم زدن و همگن سازی اولیه به کمک همزن مغناطیسی به مدت ۱۵ دقیقه انجام گرفت. به منظور تهیه امولسیون؛ ۶۰ میلی لیتر از مخلوط به داخل یک مخزن فلزی دو جداره منتقل گردید و سپس سونوتروود دستگاه مولد امواج فراصوت (مدل Vibracl 750 VCX، ساخت شرکت Sonics کشور آمریکا) به قطر ۱۹ mm، در عمق ۱ سانتی متری زیر سطح مخلوط غوطه ور گردید. سونیکاسیون و تولید امولسیون در فرکانس ۲۰ کیلو هرتز به طور مداوم و در مدت زمان ۳ دقیقه در حداکثر شدت امواج فراصوت انجام شد. دمای محلول در طول مدت صوت دهی از طریق سیرکولاسیون آب در جداره مخزن در ۲۰ درجه سانتی گراد حفظ گردید.

تنظیم pH

به منظور بررسی اثر غلظت یون هیدروژن بر ویژگی های امولسیون، pH محلول حاوی ۱۰ درصد کارژینات سدیم با استفاده از اسید کلریدریک ۰/۱ مولار در دامنه ۳ تا ۸ تنظیم شد.

اضافه کردن کلرید کلسیم

از آن جایی که اندازه ذرات و ساختار غشای قطرات در امولسیون اولیه بر پایداری آن به شدت تأثیرگذار است، کلرید کلسیم در غلظت های ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶ و ۰/۱۰ به پیش مخلوط امولسیونی حاوی کارژینات سدیم که نمونه امولسیون آن دارای کوچکترین اندازه ذرات بود، قبل از اعمال فراصوت اضافه گردید تا تأثیر حضور آن در امولسیون مورد

کمتر کارژینات/روغن، مقدار کافی از پروتئین برای پوشاندن سطح مشترک روغن-آب وجود ندارد و به همین علت معمولاً باعث ناپایداری امولسیون ها با تشکیل شبکه از طریق ایجاد پل عرضی^۱ یا تشکیل خوشه^۲ می شود. بالعکس، در نسبت های بیشتر کارژینات/روغن، حضور پروتئین های اضافی (جذب نشده) سبب بروز پدیده فلوکوله شدن نقصانی^۳ و احتمالاً در هم آمیختگی قطرات می شود؛ که نتیجه آن افزایش اندازه ذرات امولسیون می باشد

(Hogan et al., 2001; Klinkesorn et al., 2004). لذا جهت دستیابی به پایداری مطلوب، غلظت بهینه ای از کارژینات باید مورد استفاده قرار گیرد تا بتواند تمام سطح مشترک روغن-آب را بپوشاند (Dickinson et al., 1998). علاوه بر غلظت کارژینات، عوامل دیگری نظیر pH و حضور یا عدم حضور یون های فلزی نیز بر پایداری امولسیون مؤثر می باشند. مطالعه خصوصیات فیزیکی شیمیایی و عملکردی فراکسیون های کارژینات سدیم در pH های ۳ تا ۸ و دمای ۵۰ تا ۱۰۰ درجه سانتی گراد نشان داد که فراکسیون های محلول پروتئین کارژینات سدیم که حرارت دیده اند، نزدیک نقطه ایزوالکتریک کارژین ها از ظرفیت و فعالیت امولسیون کنندگی بالاتری برخوردار بودند (Jahaniaval et al., 2000). همچنین مشخص گردید که اضافه کردن یون کلسیم به امولسیون های تثبیت شده با کارژینات سدیم منجر به افزایش اندازه متوسط قطرات می گردد، اما آستانه غلظتی را برای این تأثیر تعیین نکردند (Dickinson et al., 1998). در مطالعه دیگری، نجف نجفی و همکاران (۲۰۱۰)، ضمن بررسی امکان استفاده از امواج فراصوت در تهیه نانوامولسیون ها دریافتند که غلظت امولسیفایر، یون کلسیم و pH به طور معنی داری بر اندازه ذرات امولسیون و در نتیجه پایداری آن مؤثر می باشد.

اصولاً برای تهیه یک امولسیون غذایی پایدار، درک برهم کنش های بین اجزاء تشکیل دهنده آن از قبیل پایدارکننده ها، نمک ها، امولسیفایرها و تأثیر آن ها بر خصوصیات امولسیون بسیار حائز اهمیت است. لذا این تحقیق، به بررسی تأثیر یک امولسیفایر پروتئینی (کارژینات سدیم) در سه سطح از غلظت (۲، ۵ و ۱۰٪) در pH های مختلف (۳-۸)، در حضور مقادیر مختلف از یون کلسیم و سورفاکتانت Tween 80 بر پایداری امولسیون لیمونین در آب بر پایداری امولسیون های تهیه شده با امواج فراصوت می پردازد.

مواد و روش ها

مواد شیمیایی

کارژینات سدیم (حاوی ۹۰٪ پروتئین و ۰/۰۱٪ کلسیم) و

- 1- Bridging network
- 2- Cluster formation
- 3- Depletion flocculation

مطالعه قرار گیرد.

اندازه گیری قطر و سطح مخصوص ذرات امولسیون

متوسط قطر، توزیع اندازه و سطح مخصوص ذرات با کمک دستگاه سنجش اندازه ذرات (مدل Fritsch Analysette 22، کشور آلمان) انجام شد. این دستگاه قطر ذرات را بر اساس تئوری Mie و از روی پراکنش اشعه لیزر محاسبه نموده و میانگین قطر را تحت عنوان عدد ساتر (Sauter) یا میانگین قطر سطح-وزن (D_{32}) به دست می‌دهد. سطح مخصوص ذرات (SSA) نیز بر حسب m^2/ml از روی قطر متوسط به صورت ذیل محاسبه شد:

$$D_{32} = \frac{\sum z_i d_i^3}{\sum z_i d_i^2} \quad (1)$$

$$SSA = 6 / D_{32} \quad (2)$$

برای مقایسه درجه یکنواختی اندازه ذرات نمونه‌ها از شاخصی به

نام Span که از معادله ذیل محاسبه می‌شود، استفاده شد:

$$\text{Span} = \frac{[d(v,90) - d(v,10)]}{d(v,50)} \quad (3)$$

در این فرمول $d(v,90)$ ، $d(v,10)$ و $d(v,50)$ به ترتیب قطر متوسط ۹۰، ۱۰ و ۵۰ درصد قطرات می‌باشند.

محاسبات آماری

داده‌های بدست آمده در آزمایشات فوق‌الذکر در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از آزمایش فاکتوریل و نرم افزار 13.1 Minitab تجزیه و تحلیل گردیدند. برای مقایسه میانگین‌ها در تیمارهای مورد بررسی از آزمون دانکن در سطح ۹۵٪ استفاده شد. کلیه آزمایشات در ۳ تکرار انجام گرفت.

نتایج و بحث

تأثیر غلظت کازئینات سدیم و لیمونین بر خصوصیات

امولسیون

توزیع اندازه قطرات امولسیون و قطر متوسط آنها سهم مهمی در تعیین ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و پایداری آن دارد؛ به طوری که سرعت و روند کلیه مکانیسم‌های ناپایداری به خصوص به هم پیوستن، در هم آمیختن، خامه‌ای شدن و شکست امولسیون و نیز صفات ظاهری، ارگانولپتیک و رئولوژیک را مستقیماً تحت الشعاع قرار می‌دهد.

بررسی روند تغییرات اندازه قطرات در پاسخ به سطوح مختلف غلظت کازئینات سدیم و لیمونین مشخص کرد که با افزایش غلظت این بیوپلیمر قطر گویچه‌ها به طور معنی‌داری کاهش یافت (شکل

۱). همچنین نشان داده شد که تأثیر غلظت آن‌ها بر روی سطح مخصوص قطرات کاملاً معنی‌دار بود به طوری که گویچه‌های لیمونین موجود در امولسیون حاوی ۱۰٪ کازئینات سدیم سطح مخصوص به مراتب بزرگتری نسبت به قطرات موجود در امولسیون‌های تهیه شده با ۵ و ۲٪ از آن داشتند ($p < 0.01$). علاوه بر این نتایج بررسی اسپان منحنی‌های توزیع اندازه ذرات نمونه‌های امولسیونی حاکی از آن بود که با افزایش غلظت کازئینات سدیم و لیمونین، مقدار عددی این شاخص کاهش یافت و یا به عبارت دیگر درجه یکنواختی اندازه گویچه‌ها بیشتر شد (جدول ۱). از سوی دیگر بررسی شکل منحنی‌های توزیع اندازه قطرات نمونه‌های امولسیون دلالت بر این داشت که همگی آنها از نوع منومودال^۱ یا تک کوهانه بودند و توزیع اندازه ذرات نیز به صورت نرمال بود. شایان ذکر است که با افزایش غلظت کازئینات سدیم و لیمونین، توزیع اندازه قطرات به صورت نرمال باقی ماند، اما شکل آن باریک‌تر و تیزتر شد؛ ضمن این که به سمت چپ نیز تغییر مکان داد. این مشاهدات به این معناست که جمعیت قطرات با اندازه کوچکتر با افزایش غلظت بالای کازئینات سدیم بیشتر شد و نایکنواختی اندازه آنها کاهش یافت (شکل ۲).

از طرف دیگر در طی ۴۸ ساعت نگهداری نمونه‌های امولسیون، منحنی‌های توزیع اندازه قطرات به تدریج به سمت راست تغییر مکان دادند (اندازه قطرات بزرگ‌تر شد) (شکل ۳) و متوسط قطر قطرات و عدد اسپان افزایش پیدا کرد (شکل ۴). به طور کلی افزایش قطر متوسط قطرات در طی نگهداری نشان‌دهنده وقوع پدیده‌های ناپایداری از جمله تجمع، به هم پیوستن و در هم آمیختن قطرات است که از نظر رئولوژیکی، وقوع این پدیده‌ها معمولاً با کاهش ویسکوزیته (Tadros et al., 2004) و از نظر ظاهری با خامه بستن و شکست امولسیون همراه است.

در همین رابطه Hogan و همکاران (۲۰۰۱) در پژوهشی به منظور بررسی خصوصیات امولسیون‌کنندگی و ریزپوشانی کازئینات سدیم به تنهایی و در ترکیب با کربوهیدرات‌ها دریافتند که کازئینات سدیم در غلظت‌های ۱۰، ۳۰ و ۴۰٪ باعث ایجاد تفاوت معنی‌داری در اندازه قطرات نگردید. از سوی دیگر Ye (۲۰۰۸)، در تحقیقی مشابه گزارش کرد که اندازه قطرات امولسیون با افزایش غلظت کازئینات سدیم کاهش یافت. چنان که ملاحظه می‌شود نتایج یکسانی در رابطه با تأثیر غلظت کازئینات سدیم و لیمونین بر اندازه قطرات وجود ندارد که عمدتاً به علت تفاوت در دامنه غلظت‌های مورد بررسی می‌باشد. بنا بر این با توجه به این حقیقت و با در نظر گرفتن نتایج تحقیقات انجام شده می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد در هر سامانه امولسیونی بسته به ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آن و حضور سایر سورفکتانت‌ها و ترکیبات فعال در سطح غلظت بهینه‌ای

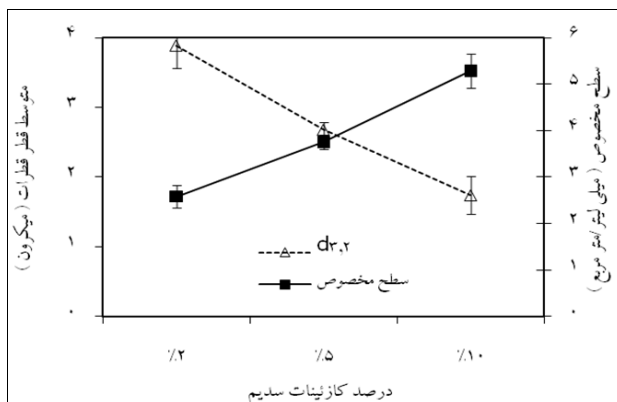
سدیم (pH = ۵) و کوچکترین اندازه (۵۶۰ نانومتر) در pH = ۷، مشاهده شد. اندازه متوسط گویچه ها در pH = ۳ حدواسط pH های ۵ و ۷ و برابر با ۷/۶۵ میکرون بود. این افزایش در قطر گویچه ها را می توان به تغییرات ساختمانی کازئینات سدیم در واکنش به pH محیط نسبت داد. میزان آبگریزی و توزیع اسیدهای آمینه اسیدی و بازی در فراکسیون های سازنده کازئینات سدیم و در نتیجه واکنش آن ها به تغییرات محیطی از جمله pH متفاوت می باشد.

کازئینات سدیم در pH بالاتر از نقطه ایزوالکتریک خود، بار منفی دارد. بنابراین در سامانه های امولسیونی، حضور مولکول های کازئینات سدیم در سطح مشترک قطرات روغن و آب باعث می شود که از طریق ایجاد دافعه الکترواستاتیک و نیز ممانعت فضایی از به هم نزدیک شدن قطرات به یکدیگر و در نتیجه از به هم پیوستن و یا تجمع آن ها جلوگیری نمایند نکردند (Dickinson et al., 1998).

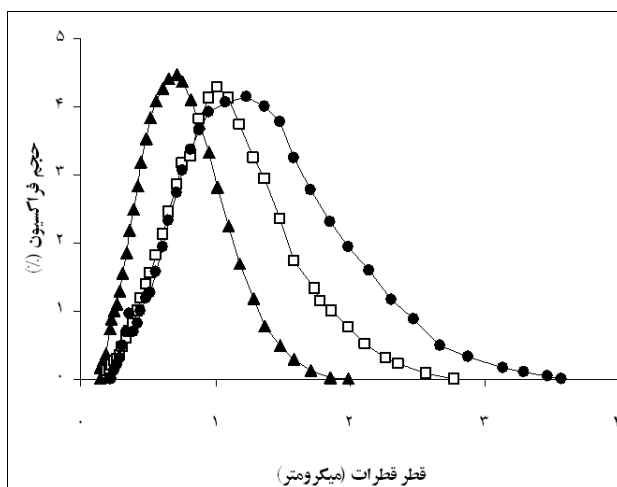
برای کازئینات سدیم وجود دارد؛ به طوری که در پایین تر از آن با افزایش مقدار کازئینات سدیم اندازه ذرات کاهش می یابد اما در بالاتر از آن تغییرات غلظت تأثیر چندانی بر اندازه ذرات ندارد، هر چند ممکن است به علت بروز پدیده به هم پیوستگی نقصانی اثر عکس نیز داشته باشد.

تأثیر pH بر خصوصیات امولسیون

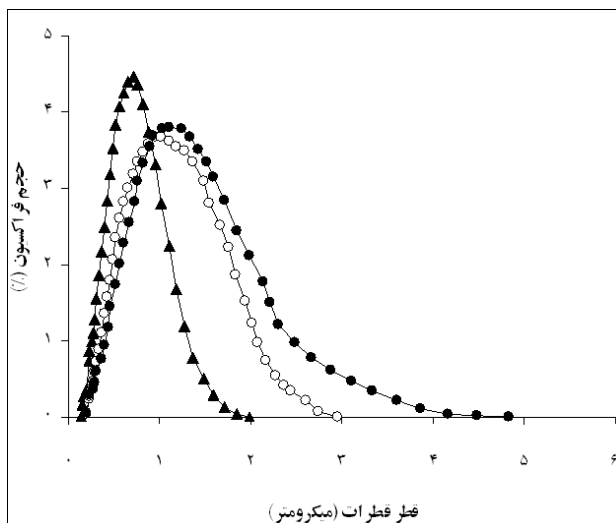
نتایج آزمایشات حاکی از این بود که pH فاز پیوسته تأثیر معنی داری بر اندازه، سطح مخصوص قطرات و عدد اسپان منحنی توزیع اندازه آنها داشت (p<0.05). چنان که در شکل ۵ ملاحظه می شود، کاهش pH از محدوده خنثی به کاملاً اسیدی موجب افزایش قطر گویچه ها گردید، به طوری که بزرگترین اندازه (۱۰/۵۳ میکرون) برای گویچه های لیمونین در نزدیک نقطه ایزوالکتریک کازئینات



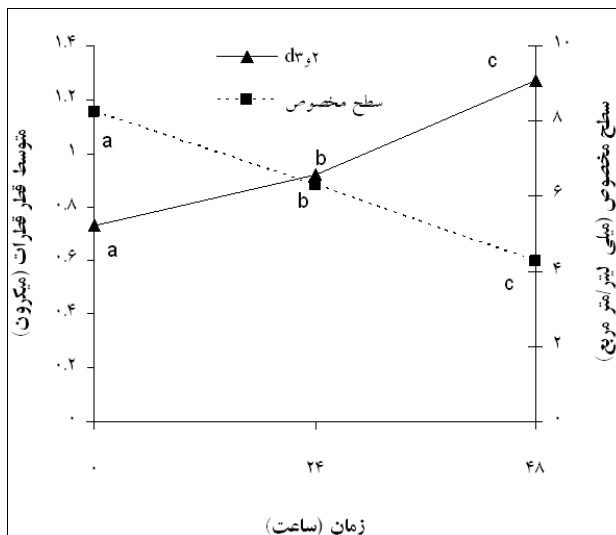
شکل ۱- تأثیر غلظت کازئینات سدیم بر متوسط اندازه و سطح مخصوص قطرات امولسیون



شکل ۲- منحنی توزیع اندازه قطرات امولسیون در غلظت های مختلف کازئینات سدیم (۲٪، ۵٪ و ۱۰٪)



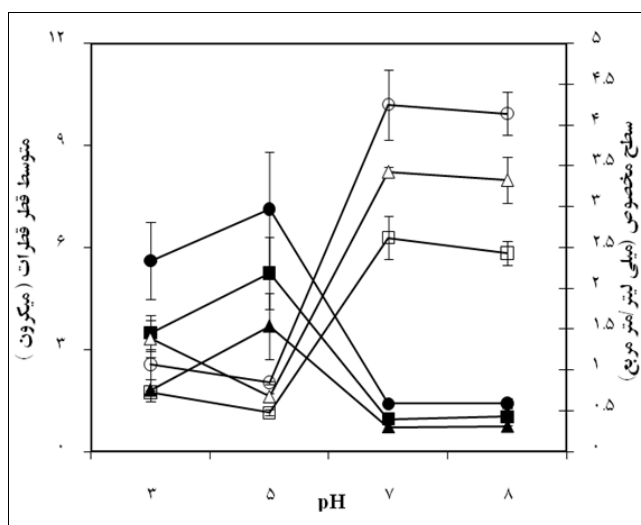
شکل ۳- منحنی توزیع اندازه قطرات امولسیون دارای ۱۰٪ کازئینات سدیم در زمان‌های بلافاصله (▲)، ۲۴ (○) و ۴۸ ساعت پس از تولید (●).



شکل ۴- تأثیر مدت زمان نگهداری بر متوسط اندازه و سطح مخصوص قطرات امولسیون دارای ۱۰٪ کازئینات سدیم.

ایجاد می‌شوند. این نتایج تأیید کننده گزارش‌هایی است که نشان می‌دهد در محدوده pH ۴ تا ۵ ظرفیت امولسیون کنندگی کازئینات سدیم کاهش می‌یابد (Krog et al., 2004; Dagleish et al., 1995). از سوی دیگر در pH پایین‌تر از نقطه ایزوالکتریک، میسل کازئین مجدداً بار الکتریکی پیدا می‌کند و از این رو با ایجاد دافعه الکترواستاتیک بین قطرات مانع از به هم پیوستن آن‌ها می‌شود. به نظر می‌رسد در این شرایط میزان نیروی دافعه به اندازه $\gamma = 7$ pH نیست و به همین دلیل اندازه قطرات بزرگ‌تر می‌باشد. شایان ذکر است که Surh و همکاران (۲۰۰۶) به نتایجی مشابه این پژوهش دست یافتند

با تغییر pH و حرکت به سمت نقطه ایزوالکتریک، بار الکتریکی خالص کازئینات سدیم به صفر می‌رسد و به لحاظ تغییر در آرایش فضایی آن و توزیع اسیدهای آمینه آبدوست و آبگریز سطح میسل نیز دچار تغییر می‌شود. این تغییرات منجر به کاهش چشمگیری در حلالیت کازئینات سدیم و از بین رفتن دافعه الکترواستاتیک بین میسل‌ها می‌گردد نکردند (Klinkesorn et al., 2004). در نتیجه به واسطه فقدان نیروهای دافعه؛ قطرات لیمونین به هم نزدیک شده و به تدریج به یکدیگر می‌پیوندند که نتیجه آن ایجاد قطرات درشت‌تر و یا شبکه‌های متراکمی است که از طریق جاذبه واندروالسی و آبگریزی بین میسل‌های کازئین موجود در سطح مشترک قطرات روغن-آب



شکل ۵- تأثیر pH و غلظت کازئینات سدیم (۲٪، ۵٪ و ۱۰٪) بر اندازه و سطح مخصوص قطرات امولسیون (توپر: d_{3,2} و توخالی: سطح مخصوص)

جدول ۱- عدد اسپان منحنی توزیع اندازه ذرات نمونه های امولسیون در غلظت های مختلف کازئینات سدیم و pH های متفاوت فاز پیوسته

pH				غلظت کازئینات سدیم
۸	۷	۵	۳	
۳/۱۱ ± ۰/۱۸	۳/۳۱ ± ۰/۲۲	۸/۶۶ ± ۰/۷۱	۴/۹۴ ± ۰/۲۳	۲٪
۲/۶۵ ± ۰/۴۵	۳/۰۲ ± ۰/۱۳	۵/۹۹ ± ۰/۱۶	۲/۴۷ ± ۰/۴۰	۵٪
۱/۶۱ ± ۰/۱۱	۱/۳۰ ± ۰/۱۱	۴/۰۲ ± ۰/۱۳	۲/۰۰ ± ۰/۱۵	۱۰٪

توزیع اندازه قطرات امولسیون نیز تا غلظت ۱/۵٪ Tween 80 کاهش و سپس افزایش پیدا کرد. کاهش اندازه قطرات لیمونین با افزایش غلظت Tween 80 را می توان به بالاتر بودن فعالیت سطحی آن در مقایسه با کازئینات سدیم مربوط دانست. پایین تر بودن وزن مولکولی این ترکیب باعث می شود که بتواند با سرعت بیشتری خود را به سطح قطرات کوچک روغن در منطقه کاپیتاسیون رسانده و مانع از به هم پیوستن و امتزاج آن ها بعد از تشکیل گردد. از سوی دیگر افزایش قطر گویچه ها در غلظت های بالاتر به علت شروع به هم پیوستگی نقصانی، جایگزینی ملکول های کازئینات سدیم در سطح مشترک قطرات لیمونین- آب با Tween 80 و رانش آنها به داخل فاز آبی، بر هم کنش با ملکول های کازئینات سدیم و تغییر ساختار سه بعدی و قدرت امولسیون کنندگی آنها و یا ایجاد پیوندهای عرضی بین قطرات می باشد. تعیین مکانیسم غالب در این شرایط مستلزم انجام آزمایشات تکمیلی است که می تواند در پژوهش های آتی مورد بررسی قرار گیرد. در همین رابطه در تحقیقی مشابه، Dickinson و همکاران

آنها نشان دادند که کوچکترین اندازه قطرات برای امولسیون حاوی کازئینات سدیم که به روش همگن سازی تحت فشار تولید شده بود در pH = 7 حاصل گردید و با کاهش pH تا نقطه ایزو الکتریک اندازه قطرات به شکل معنی داری افزایش یافت. همچنین Perrechil و همکاران (۲۰۰۹) نیز گزارش کردند که اندازه قطرات امولسیون تثبیت شده با کازئینات سدیم در pH = 7 کوچک و سپس با کاهش pH در حدود نقطه ایزو الکتریک افزایش یافت، اما مجدداً با کاهش pH تا حدود ۲/۶ کوچک تر گردید. نجف نجفی و همکاران (۲۰۱۰)، عنوان کردند با کاهش pH امولسیون تا نقطه ایزوالکتریک کازئینات سدیم، اندازه قطرات به شکل معنی داری افزایش یافت.

تأثیر غلظت Tween 80

همان طوری که در جدول ۲ نشان داده شده است با افزایش غلظت Tween 80 تا مقدار ۱/۵٪، متوسط قطر گویچه ها کاهش و سطح مخصوص آنها افزایش یافت، همچنین عدد اسپان منحنی

گویچه‌ها کاهش یافت و حتی به کمتر از اندازه اولیه آنها در شرایط بدون کلسیم (۰/۷۴ میکرون) رسید؛ هر چند این اختلاف از نظر آماری معنی دار نبود ($p < 0.05$). از سوی دیگر در غلظت‌های بالاتر مجدداً قطر گویچه‌ها بزرگ‌تر گردید. نگاهی به منحنی توزیع اندازه قطرات (شکل ۶) به روشنی نشان می‌دهد که تمامی منحنی‌ها منومodal بودند و همان طوری که نتایج جدول ۳ نیز مشخص می‌کند منحنی توزیع اندازه قطرات مربوط به امولسیون حاوی ۰/۴ درصد یون کلسیم دارای عدد اسپان کمتری بود. لازم به ذکر است که در غلظت‌های کمتر یا بالاتر از ۰/۴ درصد یون کلسیم، منحنی توزیع اندازه قطرات به سمت راست تغییر مکان داد. این‌جا به جایی در منحنی توزیع اندازه ذرات بدین معنی است که در نمونه‌های دارای ۰/۲ و ۰/۶ درصد یون کلسیم تراکم قطرات با اندازه بزرگ‌تر بیشتر و پراکندگی اندازه آنها گسترده‌تر بود؛ به عبارت دیگر گویچه‌ها از درجه نایک‌نواختی بیشتری در اندازه برخوردار بودند.

در طی نگهداری نمونه‌های امولسیونی حاوی ۰/۴ درصد یون کلسیم، منحنی توزیع اندازه قطرات تا ۴۸ ساعت پس از تولید به تدریج به سمت راست تغییر مکان داد (اندازه ذرات امولسیون بزرگ‌تر شد). مقایسه این منحنی‌ها با منحنی‌های مربوط به نمونه‌های امولسیونی فاقد یون کلسیم مشخص کرد که نمونه‌های دارای کلسیم از ثبات بیشتری برخوردار بودند (شکل ۷). به عبارت دیگر نمونه‌های امولسیونی دارای ۰/۴ درصد کلسیم از نظر اندازه قطرات از یکنواختی بیشتری برخوردار بودند. به طور کلی افزایش قطر متوسط قطرات در طی نگهداری نشان دهنده وقوع پدیده‌های بی‌ثباتی از قبیل تجمع، به هم پیوستگی و در هم آمیختگی قطرات است (پریچلی و همکاران، ۲۰۰۹). شناسایی مکانیسم دقیق رشد تدریجی اندازه گویچه‌ها نیازمند انجام آزمایشات تخصصی و تکمیلی است که خارج از اهداف از پیش تعیین شده در این پژوهش می‌باشد. با این حال نتایج آزمایشات اولیه مشخص کرد که علت افزایش اندازه قطرات هر چه باشد روند آن در نمونه امولسیونی دارای ۰/۴ درصد یون کلسیم کندتر از نمونه‌های فاقد کلسیم است (شکل ۸). گزارشات موجود در این رابطه حاکی از این است که افزودن یون کلسیم می‌تواند از به هم پیوستگی نقصانی سامانه‌های امولسیونی تشبیت شده با کارژینات سدیم جلوگیری نماید (Pitkowski et al., 2009).

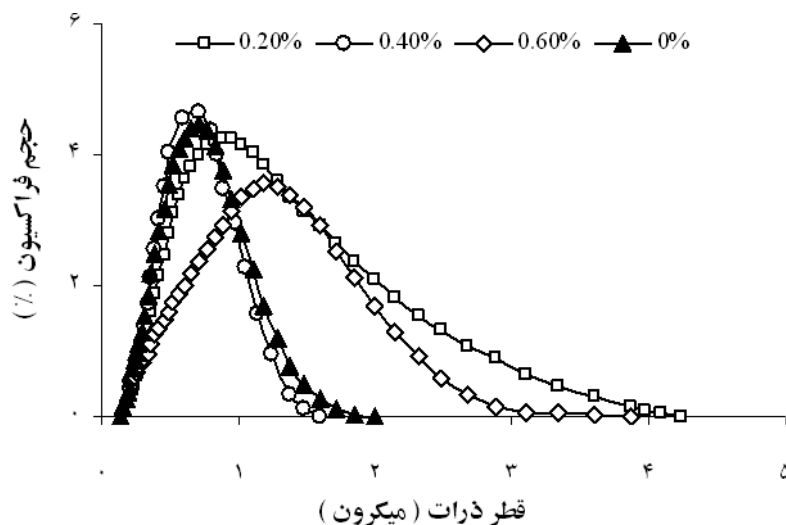
(۲۰۰۳) دریافتند که افزایش غلظت Tween 20 در امولسیون پایدار شده با کارژینات سدیم ابتدا باعث کاهش اندازه قطرات و سپس سبب بزرگ شدن آنها گردید. آنها این رویداد را به بی‌ثبات شدن امولسیون در غلظت‌های بالای Tween 20 در اثر وقوع پدیده به هم پیوستگی نقصانی مربوط دانستند. تحقیقات انجام شده توسط دیگر پژوهشگران نشان می‌دهد که در سامانه‌های امولسیونی حاوی امولسیفایرهای منومری و هیدروکلوئیدهای پلی‌مری، منومرها به هیدروکلوئیدها متصل شده و با ایجاد تغییر در آرایش فضایی آن‌ها ظرفیت امولسیون‌کنندگی آن‌ها را تغییر می‌دهند. معمولاً در غلظت‌های کم این بر هم کنش‌ها موجب افزایش ظرفیت امولسیون‌کنندگی پلی‌مرها می‌گردد، اما در غلظت‌های بالا به دلیل دگرگونی بیش از حد ساختار فضایی پلیمرها و نیز رقابت منومرها با آن‌ها در پوشش دهی سطح گویچه‌ها، از سطح مشترک قطرات روغن-آب جدا شده و وارد فاز آبی می‌شوند. نتیجه این بر هم کنش‌ها پوشش ناکافی سطح مشترک و اتصال گویچه‌های روغن به یکدیگر و افزایش اندازه آنها خواهد بود (Nylander, 2004). نکته حائز اهمیت دیگر این است که در غیاب امولسیفایرهای منومری که فعالیت سطحی به مراتب بالاتری از پلی‌مرها دارند و بلافاصله بعد از خرد شدن قطرات روغن به سرعت خود را به سطح آنها می‌رسانند، انواع پلی‌مری حتی در صورت داشتن ظرفیت امولسیون‌کنندگی بالا به تنهایی قادر نیستند چنین فعالیت سطحی را از خود نشان دهند و بنابراین معمولاً قطرات قبل از رسیدن پلی‌مر به سطح آنها به یکدیگر می‌پیوندند و در نتیجه گویچه‌های امولسیفیه شده، درشت‌تر خواهند بود (Goddard et al. 1993).

تأثیر غلظت یون کلسیم

به منظور بررسی اثر یون دو ظرفیتی کلسیم، به عنوان یکی از یون‌های معمول در مواد غذایی، بر خصوصیات نمونه‌های امولسیونی تهیه شده، مقادیر مختلفی از آن به امولسیون حاوی ۱۰٪ کارژینات سدیم اضافه گردید. چنان که در جدول ۳ ملاحظه می‌شود؛ در حضور یون کلسیم اندازه قطرات و سطح مخصوص آن‌ها تغییر یافت، به طوری که با افزایش غلظت یون کلسیم به ۰/۲ درصد قطر قطرات نیز افزایش نشان داد (۱/۲۳ میکرون) ولی در غلظت ۰/۴ درصد اندازه

جدول ۲- تأثیر غلظت Tween 80 بر متوسط اندازه، سطح مخصوص و عدد اسپان امولسیون حاوی ۱۰٪ کارژینات سدیم

Tween 80%	۰	۰/۵	۱	۱/۵	۲
قطر متوسط قطرات (μm)	$2/25 \pm 0/05$	$0/73 \pm 0/01$	$0/61 \pm 0/08$	$0/32 \pm 0/01$	$0/92 \pm 0/03$
سطح مخصوص (m^2/ml)	$2/6694 \pm 0/07$	$8/2271 \pm 0/13$	$10/022 \pm 1/40$	$18/7566 \pm 0/87$	$6/5118 \pm 0/21$
کارژینات سدیم ۱۰٪	$2/20 \pm 0/11$	$1/30 \pm 0/11$	$1/26 \pm 0/14$	$1/02 \pm 0/04$	$1/58 \pm 0/05$



شکل ۶- تأثیر غلظت یون کلسیم بر توزیع اندازه قطرات امولسیون دارای ۱۰٪ کازئینات سدیم

جدول ۳- تأثیر غلظت یون کلسیم بر قطر متوسط، سطح مخصوص و عدد اسپان امولسیون دارای غلظت ۱۰٪ کازئینات سدیم

غلظت یون کلسیم (%)	۰	۰/۲	۰/۴	۰/۶
قطر متوسط قطرات (μm)	۰/۷۴ ± ۰/۰۱	۱/۲۳ ± ۰/۱۵	۰/۶۱ ± ۰/۰۱	۱/۰۴ ± ۰/۰۸
سطح مخصوص (m ² /ml)	۸/۲۲۷۱ ± ۰/۱۳	۵/۰۱۸۳ ± ۰/۷۳	۹/۸۰۵۸ ± ۰/۱۵	۵/۷۸۷۱ ± ۰/۴۹
عدد اسپان	۱/۳۰ ± ۰/۱۱	۳/۸۹ ± ۰/۳۴	۱/۳۲ ± ۰/۲۴	۳/۴۴ ± ۰/۳۲

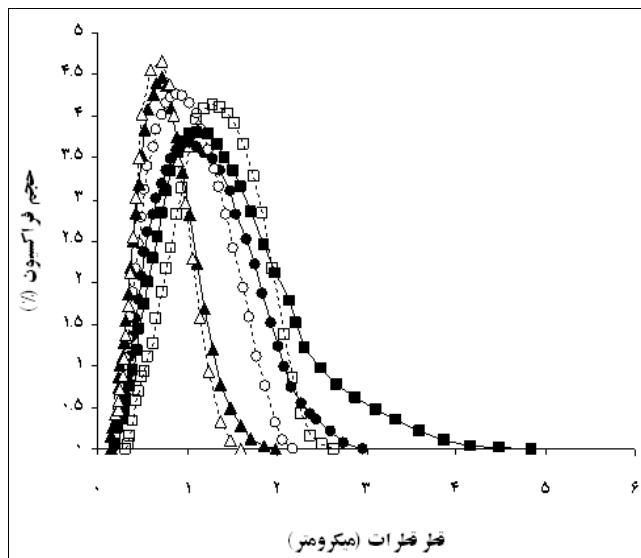
اتصالات عرضی ایجاد می شود که می تواند باعث به هم پیوستن و تجمع قطرات گردد (Klinkesorn *et al.*, 2004) (ویندهب و همکاران، ۲۰۰۵). بنابر این چنان که ملاحظه می شود تغییرات و برهم کنش های مختلفی در حضور یون کلسیم اتفاق می افتد که نوع و دامنه آنها به غلظت یون کلسیم و شرایط محیطی بستگی دارد.

همچنین نشان داده شده که در امولسیون هایی که دارای مقادیر اضافی از کازئینات جذب نشده می باشند، که اضافه کردن یون کلسیم سبب بزرگ شدن اندازه متوسط میسل های متراکم در فاز آبی می گردد و ممکن است باعث توزیع مجدد کازئین جذب نشده در لایه جذبی گردد.

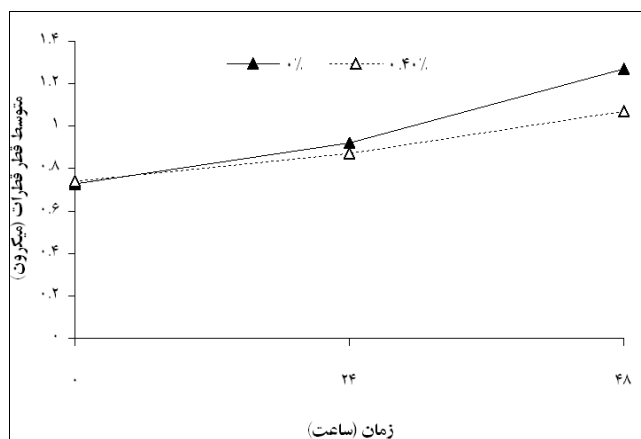
لازم به ذکر است که نتایج بدست آمده در این پژوهش با مشاهدات گزارش شده توسط محققین مختلف از جمله Dickinson و همکاران (۱۹۹۸)، Radford و همکاران (۲۰۰۴)، Pitkowski و همکاران (۲۰۰۹) و نجف نجفی و همکاران (۲۰۱۰) یکسان است. این پژوهشگران نشان دادند که اندازه قطرات امولسیون با افزایش غلظت یون کلسیم بزرگ تر شد و علت آن را ایجاد پل های عرضی بین گویچه ها مربوط دانستند.

توضیح مکانیسم این برهم کنش ها چندان ساده نیست؛ زیرا یون کلسیم بسته به غلظت آن می تواند اثرات مختلفی بر پروتئین های جذب شده در سطح مشترک قطرات روغن-آب و پروتئین های موجود در فاز پیوسته داشته باشد. نتایج تحقیقات انجام شده در سطح ملکولی نشان می دهد که یون های کلسیم قادرند با واحدهای فسفوسرین موجود در کازئین ها پیوند برقرار نمایند، که نتیجه آن تغییر توزیع بار الکتریکی سطحی و خصوصیات جذبی آنها می باشد. معمولاً در اثر این برهم کنش ها آرایش فضایی^۱ و ساختار سه بعدی ملکول های کازئین جذب شده در سطح قطرات دچار تغییر شده و به علت کاهش ضخامت غشا؛ دافعه فضایی بین گویچه ها و پایداری امولسیون کاهش می یابد (Surh *et al.*, 2006). از سوی دیگر در حضور یون های دارای بار الکتریکی مخالف^۲ نظیر یون کلسیم؛ بار الکتریکی سطحی پروتئین ها و پتانسیل لایه مضاعف الکتریکی کم می شود که متعاقب آن دامنه برهم کنش های الکتروستاتیک بین غشای پروتئینی اطراف قطرات هم کاهش پیدا می کند (Tadros *et al.*, 2004). به علاوه، در بعضی مواقع در حضور یون کلسیم بین ملکول های کازئینات که سطح قطرات را پوشانده اند

1 - Conformation
2 - Counter-ions



شکل ۷- توزیع اندازه قطرات امولسیون با غلظت ۱۰٪ کازئینات سدیم در حضور ۴٪ یون کلسیم (توخالی) و بدون یون کلسیم (توپر) در زمان‌های بلافاصله (Δ)، ۲۴ (○) و ۴۸ ساعت پس از تولید (□)



شکل ۸- تأثیر مدت زمان نگهداری و غلظت یون کلسیم بر متوسط اندازه قطرات امولسیون دارای ۱۰٪ کازئینات سدیم

بیشتری نیز به سمت چپ داشت. همچنین مشخص گردید که تغییر غلظت Tween 80 به طور چشمگیری باعث تغییر اندازه قطرات و شاخص‌های کیفی امولسیون شد. دامنه این تغییرات و میزان تأثیر آن‌ها بر خواص امولسیون به غلظت Tween 80 بستگی داشت؛ به طوری که با افزایش آن از یک حد بحرانی اثرات معکوس ظاهر شد. افزون بر این مشخص گردید که pH و غلظت یون فلزی نیز تأثیر قابل ملاحظه‌ای بر پایداری امولسیون‌ها داشتند

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که غلظت کازئینات سدیم تأثیر معنی‌داری بر متوسط قطر و سطح مخصوص قطرات، توزیع اندازه آن‌ها و اسپان امولسیون لیمونین در آب داشت؛ به طوری که امولسیون‌های تهیه شده با غلظت ۱۰٪ از قطر متوسط و اسپان کوچکتری نسبت به سایر نمونه‌ها برخوردار بودند و منحنی توزیع اندازه قطرات آن‌ها ضمن این که باریک‌تر و تیزتر بود کشیدگی

منابع

Claesson, P. M., Blomberg, E., & Poptoshev, E. (2004). Surface forces and emulsion stability. In S. Friberg, K. Larsson, J. Sjöblom (Eds.), Food emulsions. New York, NY: Marcel Dekker.

- Crouzet, J. (1998). Aro[^] mes alimentaires. In: Techniques de l'ingenieur, Agroalimentaire, 4100, 1-16, Paris.
- Dalgleish, D.G. (1997). Adsorption of protein and the stability of emulsions. Trends Food Science and Technology, 8:1-6.
- Dalgleish, D.G., Srinivasan, M., & Singh, H. (1995). Surface properties of oil-in-water emulsion droplets containing casein and tween 60. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43: 2351-2355.
- Dickinson, E., & Golding, M. (1998). Influence of calcium ions on creaming and rheology of emulsions containing sodium caseinate. Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects, 144:167-177.
- Dickinson, E., Golding, M., & Povey, M.J.W. (1997). Creaming and flocculation of oil-in-water emulsions containing sodium caseinate. Journal of Colloid and Interface Science, 185: 515-529.
- Dickinson, E., Radford, S.J., & Golding, M. (2003). Stability and rheology of emulsions containing sodium caseinate: combined effects of ionic calcium and non-ionic surfactant. Food Hydrocolloids, 16: 153-160.
- Dickinson, E., Semenova, M. G., & Antipova, A.S. (1998). Salt stability of casein emulsions. Food Hydrocolloids, 12: 227-235.
- Goddard, E.D., & Ananthapadmanabhan, K.P. (1993). Interaction of surfactants with polymers and proteins, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Hogan, S.A., McNamee, B.F., Dolores O'Riordan, E., & O'Sullivan, M. (2001). Emulsification and microencapsulation properties of sodium caseinate/carbohydrate blends. International Dairy Journal, 11: 137-144.
- Jahaniaval, F., Kakuda, Y., Abraham, V., & Marcote, M.F. (2000). Soluble protein fraction from pH and heat treated sodium caseinate: physicochemical and functional properties. Food Research International, 33: 637-647.
- Klinkesorn, U., Sophanodora, P., Chinachoti, P., & McClements, D.J. (2004). Stability and rheology of corn oil-in-water emulsions containing maltodextrin. Food Research International, 37(9), 851- 859.
- Krog, N.J., & Sparso, F.V. (2004). Food emulsifiers: Their chemical and physical properties. In S. Friberg, K. Larsson, & J. Sjoblom (Eds.), Food emulsions (p. 141). New York: Marcel Dekker.
- McClements, D.J. (2004). Food emulsions: principles, practice and techniques. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- McClements, D.J. (2004). Protein - stabilized emulsions. Current Opinion in Colloid and Interfaces Science, 9, 305-313.
- Najaf Najafi, M., Kadkhodae, R., & Mortazavi, S.A. (2010). Factors influencing formation and properties of nanoemulsion stabilized by sodium caseinate and Tween 80. Iranian Food Science and Technology Research Journal, 6: 9-17.
- Nylander, Y. (2004). Interaction between proteins and lipids, In S. Friberg, K. Larsson, & J. Sjoblom (Eds.), Food emulsions (chap. 4.). New York: Marcel Dekker.
- Perrechil, F.A., & Cunha, R.L. (2009). Oil-in-water emulsions stabilized by sodium caseinate: Influence of pH, high-pressure homogenization and locust bean gum addition. Journal of Food Engineering, xxx xxx-xxx.
- Pitkowski, A., Nicolai, T., & Durand, D. (2009). Stability of caseinate solutions in the presence of calcium. Food Hydrocolloids, 23: 1164-1168.
- Radford, S.J., Dickinson, E. & Golding, M. (2004). Stability and rheology of emulsions containing sodium caseinate: combined effects of ionic calcium and alcohol. Journal of Colloid and Interface Science, 274: 673-686.
- Surh, J., Decker, E.A., & McClements, D.J. (2006). Influence of pH and pectin on properties and stability of sodium-caseinate stabilized oil-in-water emulsions. Food Hydrocolloids, 20: 607-618.
- Tadros, T., Izquierdo, R., Esquena, J., & Solans, C. (2004). Formation and stability of nano-emulsions. Advances in Colloid and Interface Science, 303-318.
- Windhab, E. J., Dressler, M., Feigl, K., Fischer, P., & Megias-Alguacil, D. (2005). Emulsion processing from single-drop deformation to design of complex processes and products. Chemical Engineering Science, 60, 8-9: 2101-2113.
- Ye, A. (2008). Interfacial composition and stability of emulsions made with mixtures of commercial sodium caseinate and whey protein concentrate. Food Chemistry, 110: 946-952.