www.rifst.ac.ir/jrifst.aspx
نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی
سال ۱۳۹۱، جلد ۱، شماره ۴، صفحات ۲۷۲-۲۵۵

JRIFST

بررسی عوامل مؤثر بر اندازه ذرات، پتانسیل زتا و ویژگی‌های رئولوژیک پایا در سامانه کلوئیدی حاوی نانو ذرات کاپاکاراگینان- کازئینات سدیم

مریم خوش منظر[۱]، بابک قنبرزاده [۲]*، حامد همیشه کار[۳]، محمود صوتی خیابانی[۴]، رضا رضایی مکرم[۴]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه تبریز
۲- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
*نویسنده مسئول (ghanbarzadeh@tabrizu.ac.ir, babakg1359@yahoo.com)
۳- استادیار مرکز تحقیقات دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
۴- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

چکیده

نانو کمپلکس‌های بیوپلیمری از طریق ایجاد و افزایش برهم‌کنش‌های الکترواستاتیک بین گروه‌های با بار مخالف در دو بیوپلیمر تولید می‌شوند. در این تحقیق، تولید و ویژگی‌های نانوکمپلکس‌های کاپاکاراگینان ـ کازئینات سدیم مورد بررسی قرار گرفت. اندازه ذرات کمپلکس کازئینات-کاراگینان به شدت به pH و غلظت دو بیوپلیمر بستگی داشت و برای هر دو پارامتر pH و غلظت، مقادیر بهینه‌ای وجود داشت. کمترین اندازه‌ی ذرات ۷۴ و ۷۵ نانومتر بود که به ترتیب در غلظت ٪۱ کازئینات سدیم، ۰/۰۳ درصد کاراگینان و ٪۰/۵ کازئینات سدیم، ۰/۰۲ درصد کاراگینان و در pH = ۴/۹ به دست آمد. کاهش pH از ۵/۳ به ۵/۱ موجب کاهش اندازه ذرات در تمامی نمونه‌ها گردید و در غلظت‌های پایین کازئینات، کاهش pH از ۵/۱ به ۴/۹ موجب کاهش بیشتر اندازه ذرات شد. داده‌های پتانسیل زتا نشان داد که در PH=۵ بار منفی کمپلکس از مجموع آن در دو بیوپلیمر بیشتر است. تمامی نمونه‌های خالص و کمپلکس رفتار رئولوژیکی نیوتنی نشان دادند و با افزایش هر دو بیوپلیمر کاراگینان و کازئینات، ویسکوزیته محلول‌های کمپلکس افزایش یافت.

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۰/۱۰
تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۲/۰۱

واژه‌های کلیدی
اسپکتروسکوپی فرو سرخ
اندازه ذرات
کاراگینان
کازئینات
نانو کمپلکس

مقدمه

پلی‌ساکاریدها و پروتئین‌ها به عنوان یک بیوپلیمر و هیدروکلوئید، کاربردهای مختلفی در صنایع غذایی می‌توانند داشته باشند که مهمترین آنها عبارتند از به عنوان قوام دهنده، ژل دهنده، پایدار کننده، امولسیفایر، تشکیل دهنده پوشش و فیلم، عامل ضد بیاتی، جایگزین چربی و انکپسولاسیون (Turgeon, & Laneuville 2006a، Aiqian, 2008؛ Aiqian, 2008). عوامل مهم تأثیرگذار بر خصوصیات این مواد، وزن مولکولی، شکل مولکولی، بار سطحی، قدرت یونی، pH، دما، غلظت و نوع برهم‌کنش‌ها بین پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدهاست (Goh et al., 2008).

در سال‌های اخیر، استفاده از نانو ذرات بیوپلیمری، در سیستم‌های غذایی و دارویی به عنوان عامل انکپسولاسیون (درون پوشانی) برای ترکیبات زیست فعال و غذا- داروها (مانند ویتامین‌ها، کاروتنوئیدها،

Archive of SID
www.SID.ir

اسیدهای چرب امگاسه، فلاوونوئیدها، استرولها و غیره) مورد توجه زیادی قرار گرفته است و در سیستم‌های رهایشی و دارو رسانی جهت انتقال هدف‌دار، کاربردهای فراوانی یافته‌اند (Jones et al., 2010).

نانو ذرات بیوپلیمری یا به تنهایی از طریق تجمع و به هم‌پیوستگی زنجیرهای یک نوع بیوپلیمر (پروتئین یا پلی‌ساکارید) و یا از طریق کنترل اتصال و کمپلکس شدن مولکول‌های پروتئین و پلی‌ساکارید، می‌توانند تولید شوند. نانو ذرات پروتئین- پلی ساکارید، به علت حفاظت شیمیایی و کلوئیدی بالاتر، نسبت به نانو ذرات بیوپلیمری خالص، بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند. پروتئین‌ها اغلب دارای بار منفی در بالای نقطه ایزوالکتریک خود(pI≈۵) و بار مثبت زیر این pH هستند و بنابراین در pHهای زیر نقطه ایزوالکتریک می‌توانند با پلی ساکاریدهای با بار منفی (pKa≈۳) بر هم‌کنش الکترواستاتیک تشکیل دهند. البته بر هم‌کنش‌های الکترو استاتیک بین پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدهای آنیونی قوی مانند کاراگینان حتی در pHهای بالا و مساوی نقطه pI نیز می‌تواند تشکیل شود (Jones et al., 2010).

پروتئین‌ها به علت داشتن هر دو نواحی آب‌گریز و آب‌دوست می‌توانند حامل خوبی برای انواع مختلف ترکیبات زیست فعال در محیط‌های آبی باشند. کازئین‌ها، پروتئین‌هایی رشته‌ای با ساختار مارپیچ تصادفی هستند که در شیر به هم متصل شده و ساب میسل ها را با قطر ۱۵-۲۰ نانومتر تشکیل می‌دهند و از به هم پیوستن ساب میسل‌ها توسط پل‌های فسفاته، میسل بزرگ تقریباً کروی تشکیل می‌شود (Turgeon & Laneuville, 2006). میسل‌ها به عنوان نانو حامل‌های طبیعیِ مواد آب‌گریز در شیر عمل می‌کنند و در برابر فرایندها حرارتی بسیار پایدارند (Aiqian, 2008). در صنعت برای تولید کازئینات، با افزودن اسید لاکتیک، اسید کلریدریک و اسید سولفوریک به شیر پس چرخ، میسل‌ها را رسوب می‌دهند و سپس به کمک سانتریفوژ، جداسازی و شسته و خشک شده و سپس با مواد قلیایی همچون هیدروکسید سدیم یا هیدروکسید پتاسیم در دمای ۸۰ - ۹۰ درجه سانتی‌گراد و ۶/۲ - ۶/۷ =pH مخلوط شده و با اسپری درایر خشک می‌شود و به عنوان کازئینات عرضه می‌شود. کازئینات‌ها یکی از بهترین پروتئین‌ها جهت اِنکپسوله کردن و اتصال به مواد آب‌گریز می‌باشند (Turgeon & Laneuville, 2006).

کاراگینان پلی ساکارید خطی و سولفاتی است که از انواع متفاوت جلبک قرمز استخراج می‌شود. ساختمان کاراگینان شامل واحدهای تکراری د-گالاکتوپیرانوز است که با پیوند گلیکوزیدی الفا ۱ به ۳ و بتا ۱ به ۴ به هم متصل شده‌اند (Imeson, 2009). کاراگینان‌ها به علت داشتن گروه آنیونی قوی (گروه سولفات)، بر خلاف پلی ساکاریدهای با گروه آنیونی ضعیف (پلی ساکاریدهای با گروه کربوکسیل مانند پکتین) می‌توانند در pH>pI نیز با پروتئین‌ها برهم‌کنش‌های الکترو استاتیک قوی بر قرار کنند و موجب تشکیل ذرات کلوئیدی پایدار با بار منفی گردند که از این خاصیت در جلوگیری از رسوب کازئین در فرآورده های لبنی با pH خنثی، مانند شیر کاکائو، استفاده می‌گردد (Anal et al., 2008).

در سال‌های اخیر، مطالعات گسترده‌ای برای تولید و به‌کارگیری نانو و میکرو کمپلکس‌های پروتئین‌های مختلف (مانند کازئینات، بتالاکتوگلوبولین، زئین، ژلاتین و غیره) با پلی‌ساکاریدهای آنیونی (مانند پکتین، صمغ عربی، آلژینات و کاراگینان) انجام گردیده است (Ye et al., 2006; Peinado et al., 2010; Harnsilawata et al., 2006 a, Zimet et al., 2011). Anal و همکاران (۲۰۰۸) به تهیه و ارزیابی نانوکمپلکس کیتوزان- کازئینات پرداختند و نشان دادند که این کمپلکس در محدوده pH بین ۴/۸ تا ۶ بسیار پایدار بوده و دارای ابعاد بین ۲۵۰ تا ۳۵۰ نانومتر می‌باشند ولی در بالای pH=۶، ذرات در ابعاد بزرگ تشکیل می‌شود که منجر به جدا شدن فازها می‌گردد. این نانوکمپلکس‌ها می‌توانند به عنوان حامل اسیدهای چرب ضروری و مواد مغذی - دارویی به کاربرده شوند.

در این پژوهش ابتدا تشکیل کمپلکس کازئینات-کاراگینان توسط آزمون اسپکتروسکوپی فرو سرخ (FTIR) و سپس اثر pH بر پتانسیل زتا، اندازه ذرات و توزیع آنها مورد بررسی قرار خواهد گرفت و نهایتاً رفتار رئولوژیکی سیستم مطالعه خواهد شد.

Archive of SID

www.SID.ir

مواد وروشها

مواد

کاراگینان (کاپاکاراگینان) از شرکت نگین خوراک پارس و نمک‌های تری پتاسیم سیترات، دی پتاسیم هیدروژن فسفات، کلرید کلسیم، اسید کلریدریک و هیدروکسید سدیم و متانول واستونیتریل از شرکت مواد شیمیایی مرک (Merck Chemical Co. Darmstadt, Germany) تهیه شدند.

تولید نانوکمپلکس کازئینات-کاراگینان

به ۵۰ میلی‌لیتر محلول ۲٪ سدیم کازئینات، ۲ میلی‌لیتر نمک تری پتاسیم سیترات ۰/۴ مولار و دو محلول نمکی کلرید کلسیم ۰/۰۸ مولار و دی پتاسیم هیدروژن فسفات ۰/۰۸ مولار به ترتیب با مقادیر ۱۰ میلی‌لیتر و ۱۲ میلی‌لیتر طی ۸ مرحله و در فاصله زمانی ۱۵ دقیقه اضافه شدند. pH نهایی توسط HCl یا NaOH نرمال به ۷ رسانده شد. سپس حجم نهایی محلول با آب دو بار تقطیر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. پس از رساندن محلول به حجم مورد نظر و تنظیم pH در حالت خنثی، محلول‌های کارگینان قطره قطره به داخل محلول‌های بافری کازئیناتی، در دمای اتاق و دور هم‌زن ۵۰۰ rpm افزوده شد و تیتراسیون تا pH مورد نظر با HCL ۰/۱ نرمال انجام گردید. بعد از یک شبانه روز اندازه ذرات اندازه‌گیری شد.

طیف نگاره فروسرخ تبدیل فوریه (اسپکتروسکوپی (FTIR[1]

برای اندازه گیری طیف IR، ابتدا محلول حاوی کمپلکس در فریزر ۸۰°C- منجمد شد و سپس در دستگاه لیوفیلیزاتور به شکل پودر جامد خشک در آمد. جهت تهیه قرص پودر خشک شده را با برمید پتاسیم با نسبت‌های ۱ به ۱۰ مخلوط کرده و آسیاب کردیم. سپس به شکل قرص در آورده و برای آنالیز در دستگاه FTIR قرار دادیم. شیوه جذب ۴۰۰۰ cm^{-1} ۴۵۰ و تفکیک پذیری $4cm^{-1}$ مورد آزمون قرار گرفت.

تعیین اندازه ذرات

به منظور مطالعه اندازه ذرات نمونه ها از دستگاه پارتیکل سایزر استفاده شد. اندازه ذرات توسط دستگاه آنالیز کننده تفرق نوری لیزری مدل Shimadzu, Sald 1100 ساخت ژاپن انجام گرفت و اندازه نمونه‌های تهیه شده، بعد از یک شبانه روز نگهداری در دمای محیط، توسط این دستگاه تعیین شد. متوسط اندازه ذرات بر اساس میانگین قطر حجمی تعیین شد و کلیه نمونه‌ها در دو تکرار اندازه گیری شدند.

معادله(۱)

$$\overline{D}[4,3] = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3}$$

d_i: قطر ذرات؛ $\overline{D}[4,3]$: میانگین قطر حجمی (میانگین حجم معادل) یا DeBroukere mean

توزیع اندازه ذرات

توزیع اندازه ذرات از نظر کارایی و پایداری فیزیکی و خواص رئولوژیکی محصول اهمیت ویژه‌ای دارد. بنابراین در این پژوهش به منظور بررسی میزان پراکندگی ذرات از پارامتر GSD استفاده شد

توزیع اندازه ذرات با استفاده از معادله GSD (Geometric Standard Diviation) محاسبه شد:

معادله(۲)

$$GSD = \sqrt{sizesY / sizesX}$$

Y: قطری که حجم ذرات کوچکتر از آن ۸۴٪ حجم کل ذرات موجود در سیستم را تشکیل می‌دهد.

X: قطری که حجم ذرات کوچکتر از آن ۱۶٪ حجم کل ذرات موجود در سیستم را تشکیل می‌دهد.

میزان GSD کمتر، نشان‌دهنده توزیع در اندازه ذرات باریک‌تر می‌باشد.

اندازه گیری پتانسیل زتا

به منظور تعیین پتانسیل زتای نمونه‌ها، از دستگاه زتا سایزر Nano - Zs ساخت شرکت Malvern انگلستان استفاده شد.

1-Fourier Trans Form Infra-Red spectroscopy

Archive of SID
www.SID.ir

اندازه گیری خواص رئولوژیکی

ویژگی‌های رئولوژیکی کمپلکس پروتئین– پلی‌ساکارید، یک روز پس از تولید در دمای محیط توسط دستگاه رئومتر AntonPaar Physica (مدل ۱-۳ R ساخت کشور اتریش) مجهز به ژئومتری استوانه‌های هم مرکز (Concentric cylinder geometry, CC27) مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور دو غلظت از کاراگینان به همراه سه غلظت از کازئینات و در pH=۴/۹ تهیه شدند. برای این منظور مقادیر تنش برشی و ویسکوزیته به صورت تابعی از سرعت برشی (۰/۰۱- ۱۰۰ در هر ثانیه) برای تعیین نوع رفتار جریانی نمونه‌ها اندازه‌گیری شدند. آزمون پایا در محدوده نرخ برش s^{-1} ۰/۱ تا ۱۰۰ انجام شد. سپس به منظور توصیف رفتار جریانی، مدل قانون توان ($\tau = m\dot{\gamma}^n$) بر داده‌های تجربی برازش داده شد و ضریب قوام و اندیس جریان تعیین گردید.

آنالیز آماری

برای ارزیابی آماری داده‌ها و تجزیه و تحلیل نتایج از نرم افزار Minitab استفاده شد. برای ترسیم نمودارها از نرم افزار Microsoft Excel استفاده شد و برای برازش داده‌های رئولوژیکی از نرم افزار Matlab استفاده شد.

بحث و نتایج

طیف نگاره فرو سرخ تبدیل فوریه (اسپکتروسکوپی (FT – IR

طیف نگاره فروسرخ، تشخیص گروه‌های شیمیایی اصلی در پلی ساکاریدها و پروتئین‌ها و تغییر و تشکیل برهم‌کنش‌های جدید را میسر می‌سازد چون عدد موجی و شدت پیوندها و گروه‌ها برای هر پلی ساکارید و پروتئینی اختصاصی است (Sarblooki., 1995). جهت طیف سنجی از نمونه کازئینات سدیم خالص و کاراگینان خالص و کمپلکس کازئینات سدیم ٪۱ - کاراگینان٪ ۰/۰۳ استفاده شد. در پروتئین‌ها، عدد موجی بین $1200cm^{-1}$ تا $1700cm^{-1}$ مربوط به آمیدهای ۱و ۲و ۳ است. هنگامی که پلی ساکارید به پروتئین متصل می‌شود با گروه‌های بنیادین موجود روی پروتئین همچون NH_2 آزاد، NH، گروه‌های فنولی تیروزین و تیول سیستئین وارد واکنش می‌شود این ترکیبات هم از نظر کمی و هم از نظر کیفی بر اساس محل برقراری پیوند بر طیف کازئین تأثیر می‌گذارند (Santinho et al., 1999). با توجه به شکل ۱، همانطور که انتظار می‌رفت سدیم کازئینات در عدد موج cm^{-1} ۱۶۷۱ دارای یک پیک بوده و در عدد موجی $1526cm^{-1}$ نیز پیکی مشاهده می‌شود که اولی مربوط به آمید یک و دومی مربوط به آمید دو می‌تواند باشد. Santinho و همکاران (۱۹۹۹) در تحقیق خود بر روی بررسی میکرو ذرات کازئینی نیز به نتایج مشابهی دست یافتند و در پژوهش آنان نیز عدد موجی cm^{-1} ۱۶۰۰ به عنوان محل آمید یک معرفی شد.

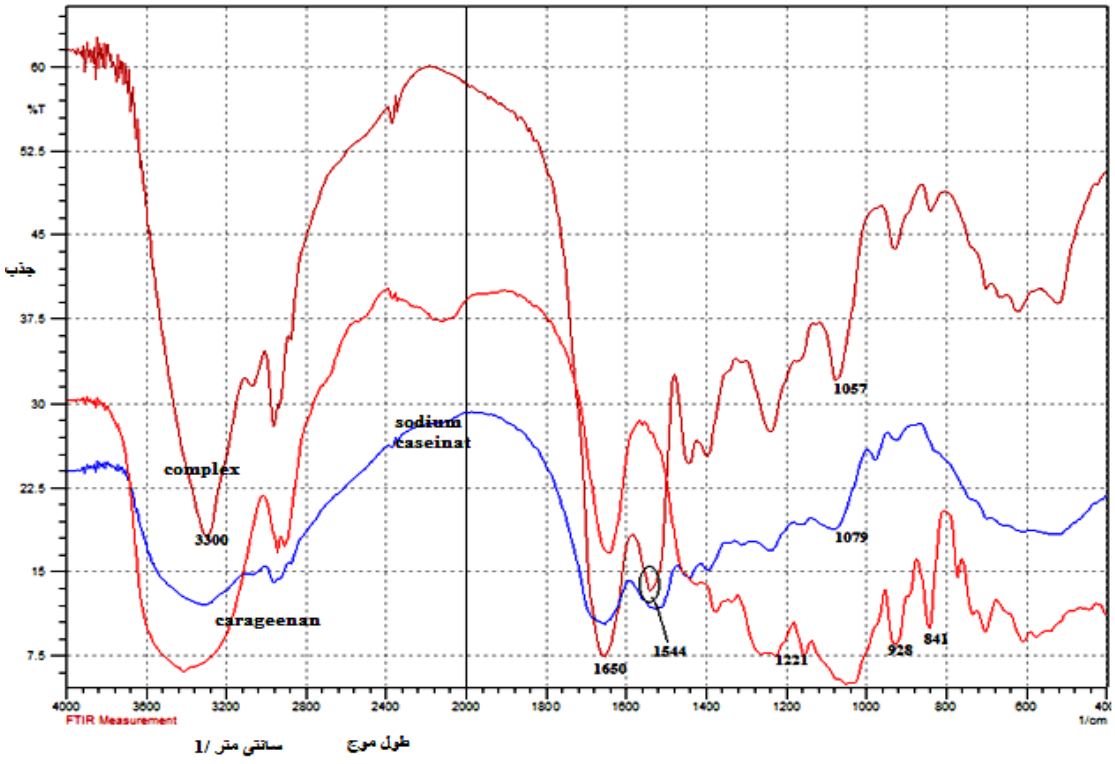
در کاراگینان، عدد موجی cm^{-1} ۱۲۲۱ با گروه سولفاتی آن مرتبط است. پیک مشاهده شده در عدد موجی cm^{-1} ۱۰۵۷ نیز پیوند گلیکوزیدی را نشان می‌دهد. پیکی که در عدد موج cm^{-1} ۹۲۸ قرار دارد، مربوط به انیدروگالاگتوز و دیگری در عدد موج $841cm^{-1}$ است که مربوط به گالاکتوز ۴ سولفات است. در تحقیقی که توسط Grenha و همکاران (۲۰۰۹) بر روی نانوکمپلکس کیتوزان- کاراگینان به عنوان حامل مواد دارویی، انجام گرفت مشخص شد که در کاراگینان، عدد موج cm^{-1} ۱۲۴۲ محل جذب گروه سولفاتی و cm^{-1} ۹۲۳ انیدرو گالاگتوز و cm^{-1} ۸۲۴ گالاکتوز ۴ سولفات است.

آنچه که در ابتدا به چشم می‌خورد، حضور هم‌زمان پیک‌های مربوط به کازئینات سدیم و کاراگینان در کمپلکس نهایی است، که البته محل پیوندها به مقدار جزئی تغییر کرده است. یکی از مهم‌ترین پیک ها مربوط به پیوند هیدروژنی است که در محدوده cm^{-1} ۳۰۰۰ تا cm^{-1} ۳۵۰۰ رخ می‌دهد. همانطور که در تصویر ۱ مشاهده می‌کنید، این پیک به ترتیب در کازئینات سدیم و کاراگینان در محل عدد موجی cm^{-1} ۳۴۲۱ و cm^{-1} ۳۳۲۳ است که در کمپلکس به طور تیزتر در عدد موجی $3300cm^{-1}$ قرار دارد که این پیک با پیوند هیدروژنی مرتبط است. جابه‌جایی جزئی در محل پیوندها، می‌تواند نشان‌دهنده برهم‌کنش بین دو پلیمر باشد. عددهای موجی cm^{-1} ۱۶۷۱ و cm^{-1} ۱۵۲۶ در نمونه کازئینات

Archive of SID

www.SID.ir

(محل پیوندهای آمیدی)، به $1650 cm^{-1}$ و $1544 cm^{-1}$ در کمپلکس جابه‌جا شده است و همین طور عدد موجی $1221 cm^{-1}$ که مربوط به گروه سولفاتی کاراگینان است، به $1250 cm^{-1}$ در کمپلکس جابه‌جا شده است. Luo و همکاران (۲۰۱۱) برهم‌کنش الکترواستاتیک بین زئین و کیتوزان حامل آلفا توکوفرول را مورد بررسی قرار دادند و جابه‌جایی عدد موجی $1664 cm^{-1}$ و $1550 cm^{-1}$ (مربوط به زئین) به $1657 cm^{-1}$ و $1542 cm^{-1}$ را، نشان دهنده‌ی تشکیل پیوند الکترواستاتیک دانستند. Honary و همکاران (۲۰۰۹) نیز، در تحقیقی به تولید و بررسی نانوکمپلکس کیتوزان و کاراگینان از طریق برهم‌کنش الکترواستاتیک پرداختند. آنها معتقدند حضور هم‌زمان پیک‌های مربوط به کیتوزان و کاراگینان در طیف مربوط به نانوکمپلکس حاکی از برهم‌کنش بین این‌هاست. در این تحقیق، پیک‌های مربوط به کیتوزان در (عددهای موجی $1569 cm^{-1}$ و $1654 cm^{-1}$ که مربوط به آمیدهاست) و همین‌طور پیک‌های کاراگینان در (عددهای موجی $1242 cm^{-1}$ و $923 cm^{-1}$ و $824 cm^{-1}$)، در طیف کمپلکس نهایی به ترتیب در عددهای موجی $1530 cm^{-1}$ و $1639 cm^{-1}$ (کیتوزان) و $1249 cm^{-1}$ و $927 cm^{-1}$ و $828 cm^{-1}$ (کاراگینان) مشاهده شدند.



شکل ۱- طیف نگاره فرو سرخ نمونه های کازئینات سدیم و کاراگینان و کمپلکس کازئینات – کاراگینان

بررسی تأثیر pH و غلظت بیوپلیمرها بر اندازه ذرات

برای اهداف کاربردی در صنایع غذایی– دارویی، هر چقدر اندازه‌ی ذرات کمپلکس تشکیل شده کوچک‌تر باشد و در محدوده‌ی مقیاس نانو قرار گیرد، بهتر است چون با کاهش اندازه‌ی ذرات، نسبت سطح به حجم، دسترسی زیستی، پایداری کلوئیدی و شفافیت محلول‌های حاوی ذرات افزایش می‌یابد. بنابراین مهم‌ترین عوامل موثر بر اندازه‌ی ذرات یعنی pH، غلظت و نسبت بیوپلیمرها مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور، سه سطح از غلظت کازئینات سدیم (۰/۵- ۱- ۱/۵ درصد وزنی-وزنی) به همراه سه

www.SID.ir

سطح از غلظت کاراگینان (۰/۰۱ -۰/۰۲- ۰/۰۳ درصد وزنی- وزنی) را در سه pH (۵/۳- ۵/۱- ۴/۹) جهت رسیدن به اندازه ذرات مناسب مورد بررسی قرار دادیم. لازم به ذکر است که در pHهای زیر ۴/۹، ذرات شروع به رسوب کردن نمودند. در جدول ۱، تأثیر هر کدام از متغیرها بر اندازه ذرات آورده شده است و همان‌طور که مشخص است تأثیر تمام متغیرها و اثر متقابل آنها بر اندازه‌ی ذرات معنی‌دار بوده و pH بیشترین تأثیر را دارد. در جدول ۲، نتایج اندازه ذرات نمونه‌ها ارائه شده است. کمترین اندازه‌ی ذرات ۷۴ و ۷۵ نانومتر بود که به ترتیب در غلظت ٪۱ کازئینات سدیم، ۰/۰۳ درصد کاراگینان و غلظت ٪۰/۵ کازئینات سدیم، ۰/۰۲ درصد کاراگینان در pH = ۴/۹ و بیشترین اندازه ذرات ۷۴۳۳ نانومتر بود که در غلظت ٪۱/۵ کازئینات سدیم، ۰/۰۳ درصد کاراگینان و۵/۳ = pH به‌دست آمد.

کازئینات سدیم در pH بالاتر از نقطه‌ی ایزوالکتریک، دارای بار منفی است و بنابراین نیروی دافعه‌ی منفی و همچنین ایجاد ممانعت فضایی، از به هم نزدیک شدن ذرات کازئینات و به هم پیوستن و توده شدن تا حدودی جلوگیری می‌نمایند. با تغییر pH و حرکت به سمت نقطه ایزوالکتریک، بار الکتریکی کازئینات به صفر می‌رسد و منجر به کاهش حلالیت کازئینات سدیم و از بین رفتن دافعه بین زنجیرها می‌شود. با کاهش pH به پایین‌تر از نقطه ایزوالکتریک، زنجیرهای کازئینات بار خالص مثبت پیدا می‌کنند و با زنجیرهای با بار منفی کاراگینان بر هم‌کنش بیشتری داده و موجب ایجاد پایداری الکترواستاتیک و همچنین پایداری ناشی از ممانعت فضایی می‌شوند.

با کاهش pH در تمامی نمونه‌ها از ۵/۳ به ۵/۱، کاهش شدیدی در اندازه‌ی ذرات مشاهده شد. اما با کاهش pH از ۵/۱ به ۴/۹، بسته به غلظت کازئینات و کاراگینان، هم کاهش و هم افزایش مشاهده گردید بطوریکه در نمونه‌های حاوی ۰/۵ درصد کازئینات، کاهش در اندازه ذرات رخ داد ولی در غلظت های ۱و ۱/۵ درصد کازئینات در اکثر نمونه‌ها افزایش جزئی در اندازه ذرات مشاهده شد. با کاهش pH، کاراگینان بیشتر و بهتر در سطح کازئینات متصل و مستقر شده و موجب افزایش نیروی دافعه می‌گردد چون با کاهش pH از ۵/۳ به ۵/۱، به علت تشکیل بارهای مثبت در کازئینات، امکان اتصال کازئینات با زنجیرهای با بار منفی کاراگینان بیشتر می‌شود و در نتیجه به علت افزایش نیروی دافعه منفی اطراف ذرات، سیستم پایدار می‌گردد و انبوهش کاهش یافته و ذرات کوچکتر می‌گردند.

افزایش بار مثبت در غلظت‌های بالای کازئینات احتمالاً موجب می‌شود که از یک طرف اتصالات بین دو بیوپلیمر کاراگینان-پروتئین افزایش یابد و در نتیجه هم اتصالات با آب کاهش می‌یابد و هم گروه‌های با بار منفی در سطح کاراگینان، کم می‌شود و در نتیجه هم امکان اتصال ذرات به هم و در نتیجه افزایش اندازه ذرات و هم تشکیل کمپلکس نامحلول افزایش می‌یابد. بنابراین pH بهینه‌ای برای این سیستم وجود دارد که ذرات کمپلکس با حداقل اندازه ذرات تشکیل می‌شود و بالاتر یا پایین‌تر از این pH اندازه ذرات افزایش می‌یابد. پژوهش‌های محققین دیگر نیز وجود pH بهینه برای سیستم‌های مختلف پروتئین-پلی‌ساکارید را تأیید می‌کند. Harnsilawata و همکاران (۲۰۰۶a)، در بررسی برهم‌کنش آلژینات و کازیئنات سدیم به این نتیجه رسیدند که در pH تقریباً ۵، یک برهم‌کنش قوی بین پروتئین و پلی‌ساکارید رخ می‌دهد و در این pH، پلی‌ساکارید به تنهایی دارای بار منفی زیادی است و تقریباً محلول است در حالی که سدیم کازئینات دارای بار خالص کمی است و نسبتاً نامحلول است و تمایل دارد توده تشکیل دهد و اسیدی کردن محیط تا نقطه‌ی ایزوالکتریک کازئینات سدیم، منجر به توده شدن پروتئین پوشش داده نشده، گردید. آنها اعلام کردند که مقادیر کافی از پلی‌ساکارید باید حضور داشته باشد تا توده‌های کوچک کازئینات سدیم جدا شده را، از خود تجمعی حفظ کند. Peinado و همکاران (۲۰۱۰)، در تحقیقی در مورد برهم‌کنش الکترواستاتیک بین پروتئین لاکتوفرین و پلی‌ساکاریدهای آنیونی (کاراگینان، پکتین و آلژینات) به این نتیجه رسیدند که با کاهش pH ۸ تا ۴، اندازه ذرات در سیستم حاوی کاراگینان (۴۵۰ نانومتر) نسبت به محلول‌های حاوی پکتین (۵۰۰ نانومتر) و آلژینات (۷۰۰ نانومتر) کوچکتر بود و با توجه به اینکه pKa کمتری (۲/۵) نسبت به پکتین و آلژینات (۳/۵) داشت، دارای

Archive of SID

www.SID.ir

پایداری بیشتری در pH های کمتر، بود. Jones و همکاران (۲۰۱۰) اعلام کردند که در محلول‌های کاراگینان– بتالاکتوگلوبولین، کاهش اندازه ذرات با کاهش pH از ۷ تا ۴/۷ مشاهده می‌شود ولی در محلول‌های پکتین-بتالاکتوگلوبولین مشاهده نمی‌شود و به‌طورکلی سیستم کاراگینان- بتالاکتوگلوبولین به تغییرات pH حساس‌تر و دارای اندازه ذرات بزرگتر در تمام pH ها نسبت به سیستم پکتین-بتالاکتوگلوبولین بود. به‌طوریکه در pH ۴/۷۵، اندازه ذرات سیستم پکتین-بتالاکتوگلوبولین حدود ۲۰۰ تا ۳۰۰ نانومتر و اندازه ذرات سیستم کاراگینان-بتالاکتوگلوبولین حدود ۷۰۰ نانومتر بود.

چنان‌که در شکل۲- a ملاحظه می‌شود افزایش غلظت کازئینات در تمامی pHها و غلظت ۰/۰۲ درصد کاراگینان (همچنین با توجه به جدول ۲ در تمامی غلظت‌های کاراگینان)، موجب افزایش اندازه ذرات گردید. افزایش غلظت کازئینات احتمالاً موجب می‌شود که مقادیر کافی کاراگینان در سطح کازئینات وجود نداشته باشد و نیروی دافعه منفی کاهش یابد. از طرفی میزان افزایش اندازه ذرات در اثر افزایش غلظت کازئینات، به شدت بهpH وابسته است و در pH های بالاتر(۵/۳)، این میزان بیشتر است. چون در pH های بالاتر، کاراگینان متصلِ کمتری در سطح پروتئین وجود خواهد داشت. افزایش اندازه ذرات با افزایش میزان پروتئین در اکثر پژوهش‌های دیگر نیز مشاهده می‌شود (Ron et al., 2010; Jones et al. 2010).

با توجه به شکل ۲ –b ، افزایش غلظت کاراگینان در غلظت ۱٪ کازئینات، در تمامی pH ها موجب افزایش اندازه ذرات شد و البته این افزایش در pHهای بالا مشهودتر است. با توجه به جدول ۲، در غلظت ۱/۵٪ کازئینات نیز همین روند مشاهده می‌شود ولی، در غلظت پایین کازئینات (۰/۵ درصد) و pH پایین (۴/۹)، افزایش غلظت کاراگینان موجب کاهش اندازه ذرات گردید. این نتایج نشان می‌دهد که در صورتی‌که مقدار مورد استفاده کاراگینان برای پوشاندن سطح کازئینات کافی باشد و pH نیز برای اتصال بهینه بین این دو پروتئین مناسب باشد، افزایش غلظت آن می‌تواند از طریق تأمین نیروی دافعه الکترواستاتیک کافی و کاهش توده شدن ذرات موجب کاهش اندازه ذرات گردد ولی با بالا رفتن مقدار پروتئین، احتمالاً به علت ناکافی بودن مقدار کاراگینان و پوشانده نشدن کامل سطح پروتئین توسط آن و ایجاد پل توسط کاراگینان بین ذرات پروتئین، لخته شدن ناشی از تشکیل پل[1] رخ داده و اندازه ذرات افزایش می‌یابد و با افزایش غلظت کاراگینان تا ۰/۰۳ درصد، این فرایند تشدید می‌گردد اگرچه ممکن است در غلظت‌های بالاتر کاراگینان، این روند به علت پوشانده شدن کامل سطح کازئینات معکوس شود (در این مطالعه، غلظت‌های بالاتر مطالعه نشده است). نتایج مشابهی توسط Ron و همکاران (۲۰۱۰) بر روی نانوکمپلکس بتالاکتوگلوبولین- پکتین حامل ویتامین D، به‌دست آمد بدین ترتیب که با کاهش pH از ۴/۵ به ۳/۵ در غلظت ثابتی از بتالاکتوگلوبولین (۰/۰۵٪)، مقدار بالاتری از پکتین (۰/۱ ٪ به جای ۰/۰۵٪) برای رسیدن به اندازه ذرات کوچکتر، مورد نیاز بود که وابستگی پروتئین به پکتین جهت جلوگیری از لخته شدن، را نشان می‌داد.

[1] - Bridging flocculation

www.SID.ir

جدول ۱- آنالیز رگرسیونی اثر pH بر اندازه ذرات

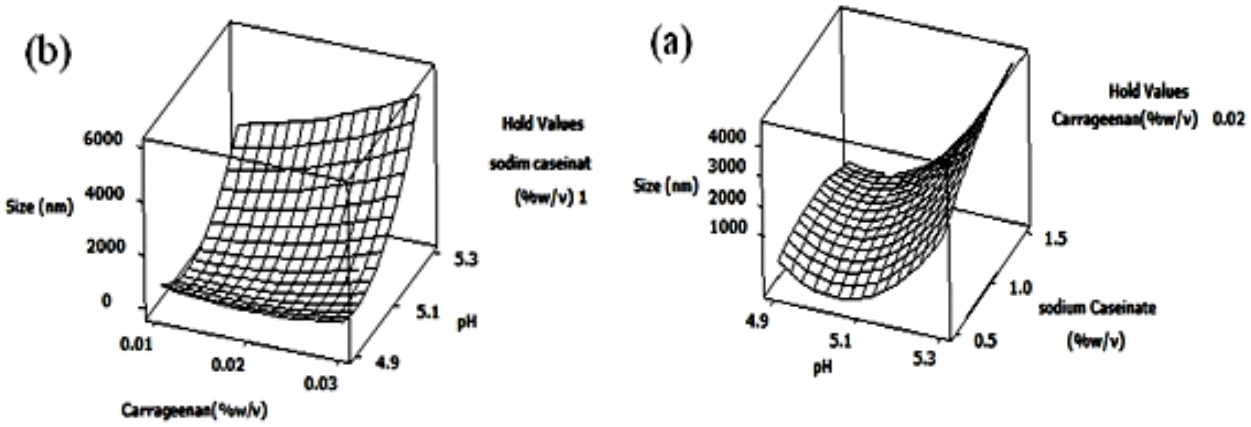
منبع تغییرات	ارزش t	ارزش p
pH	-۴/۵۳۳	۰/۰۰۰
کازئینات سدیم	-۲/۰۲۸	۰/۰۵۹
کاراگینان	-۲/۴۸۴	۰/۰۲۴
$[pH]^2$	۴/۵۱۳	۰/۰۰۰
pH × کازئینات سدیم	۲/۴۱۵	۰/۰۲۷
pH × کاراگینان	۲/۴۱۲	۰/۰۲۷

جدول ۲- نتایج اثر pH و غلظتهای مختلف کازئینات و کاراگینان بر اندازه ذرات

نمونه	سدیم کازئینات	کاراگینان	pH	GSD	میانگین قطر حجمی(نانومتر)
۱	۰/۵	۰/۰۱	۵/۳	۰/۰۱ ±۰/۱۷۱۵۶۴	/۰۱ ±۵۹۵
۲	۰/۵	۰/۰۱	۵/۱	۰/۰۲ ±۰/۷۳۸۷۲۴	۰/۰۲ ±۱۶۹/۵
۳	۰/۵	۰/۰۱	۴/۹	۰/۰۱ ±۰/۷۵۵۹۷۸	۰/۰۱ ±۱۳۹/۵
۴	۰/۵	۰/۰۲	۵/۳	۲/۲۵ ±۱/۸۴۸۶۵۷	۲/۲۵ ±۳۰۰۴
۵	۰/۵	۰/۰۲	۵/۱	۰/۰۱ ± ۰/۷۲۱۹۸	۰/۰۱ ±۱۴۵
۶	۰/۵	۰/۰۲	۴/۹	۰/۲۷ ± ۰/۵۶۸۴۳	۰/۲۷ ±۷۵
۷	۰/۵	۰/۰۳	۵/۳	۱/۱۷ ± ۱/۰۶۴۴۴	۱/۱۷ ± ۱۹۳۴/۵
۸	۰/۵	۰/۰۳	۵/۱	۰/۴۵ ± ۰/۴۵۶۷۴	۰/۴۵ ±۱۱۸
۹	۰/۵	۰/۰۳	۴/۹	۰/۲۹ ± ۰/۵۳۳۲۰	۰/۲۹ ±۷۶
۱۰	۱	۰/۰۱	۵/۳	۰/۸۹ ±۴/۰۲۹۰۲۱	۰/۸۹ ±۲۳۴۹/۵
۱۱	۱	۰/۰۱	۵/۱	۰/۰۰ ±۰/۷۴۷۵۹۵	۰/۰۵ ±۱۴۲
۱۲	۱	۰/۰۱	۴/۹	۰/۱۹±۰/۶۳۳۷۷۸۲	۰/۱۹ ±۷۴
۱۳	۱	۰/۰۲	۵/۳	۰/۰ ± ۰/۲۱۶۱۶۴	۰/۰۴ ±۳۵۵۳/۵
۱۴	۱	۰/۰۲	۵/۱	۰/۰ ± ۰/۷۴۲۷۴۶	۰/۰۱ ±۱۰۷
۱۵	۱	۰/۰۲	۴/۹	۰/۰۳ ±۰/۵۸۸۶۱۸	۰/۰۳ ±۳۰۰
۱۶	۱	۰/۰۳	۵/۳	۰/۰۰± ۰/۳۲۶۰۸۷	۲/۳۳ ±۷۳۴۴
۱۷	۱	۰/۰۳	۵/۱	۰/۴۰ ±۰/۴۲۶۲۵۹	۰/۴۰ ±۱۵۹۰/۵
۱۸	۱	۰/۰۳	۴/۹	۰/۲۲ ±۰/۴۶۱۵۵۴	۰/۲۲ ±۶۵۱
۱۹	۱/۵	۰/۰۱	۵/۳	۰/۲۹ ± ۰/۲۹۶۲۰	۰/۲۹ ±۴۱۲۲
۲۰	۱/۵	۰/۰۱	۵/۱	۰/۴۴ ±۰/۴۶۷۶۷۴	۰/۴۴ ±۱۷۸/۵
۲۱	۱/۵	۰/۰۱	۴/۹	۰/۱۳ ± ۰/۸۲۵۹۸	۰/۱۳±۱۷۷/۵
۲۲	۱/۵	۰/۰۲	۵/۳	۰/۲۲ ± ۰/۲۲۵۲۵	۰/۲۲ ±۳۶۰۵/۵
۲۳	۱/۵	۰/۰۲	۵/۱	۰/۰۰ ±۰/۷۴۴۱۱۲	۰/۰۳ ±۱۱۶
۲۴	۱/۵	۰/۰۲	۴/۹	۰/۰۱ ±۰/۷۴۸۶۱۷	۰/۰۱ ±۴۲۴
۲۵	۱/۵	۰/۰۳	۵/۳	۴/۵۳ ± ۳/۴۵۸۳۲	۴/۵۳ ±۶۶۳۹
۲۶	۱/۵	۰/۰۳	۵/۱	۰/۰۳ ±۰/۷۳۹۰۴۷	۰/۰۳ ±۶۰۶
۲۷	۱/۵	۰/۰۳	۴/۹	۰/۰۱ ±۰/۷۴۰۷۰۳	۰/۰۱ ±۱۰۲۱

Archive of SID

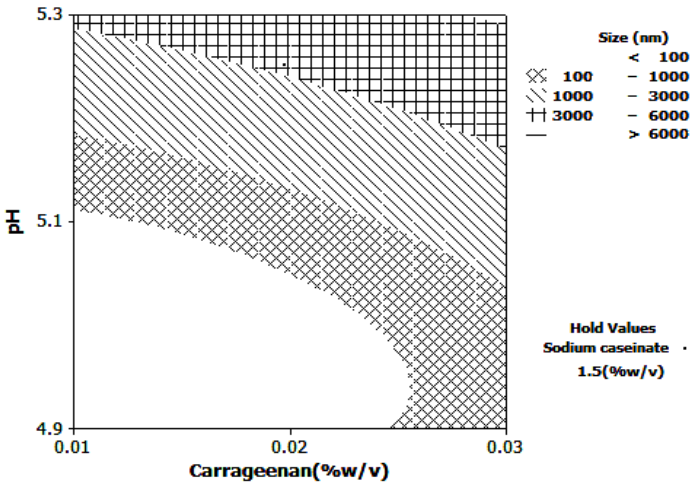
www.SID.ir



شکل ۲- نمودار سطح پاسخ تأثیر متقابل کازئینات- pH (a) و تاثیر متقابل کاراگینان -pH (b)

نمودار کانتر برای نشان دادن رابطه سه متغیر به‌کار می‌رود که در دو بعد با محور x, y رسم می‌شود و پاسخ که همان اندازه ذرات است که مثل نقشه‌های توپوگرافی نشان داده می‌شود. لازم به ذکر است در این نمودارها مقادیر ثابت (Hold value) متغیرهایی هستند که به صورت ثابت تعریف شده‌اند. شکل ۳ نمودار کانتر، در مقدار ثابت کازئینات سدیم (٪ ۱/۵)، تأثیر متقابل pH و غلظت کاراگینان بر اندازه ذرات را نشان می‌دهد.

یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های سیستم‌های کلوئیدی، توزیع اندازه ذرات است و پایداری فیزیکی و خواص رئولوژیکی محلول حاوی ذرات کمپلکس تابع اندازه و توزیع اندازه ذرات است. معمولاً با افزایش توزیع اندازه ذرات، پایداری کلوئیدی و ویسکوزیته محلول‌ها کاهش می‌یابد. در این پژوهش به منظور بررسی میزان پراکندگی ذرات از پارامتر GSD استفاده شد و در جدول شماره ۲ آورده شده است. پایین بودن مقادیر GSD نشان‌دهنده یکنواختی توزیع ذرات است و بالاترین مقادیر GSD در pH =۵/۳ مشاهده می‌شود.



شکل ۳- نمودار کانتر جهت نشان دادن تاثیر متغیرها بر اندازه ذرات در مقدار ثابت کازئینات سدیم ۱/۵ درصد

تأثیر pH بر پتانسیل زتا

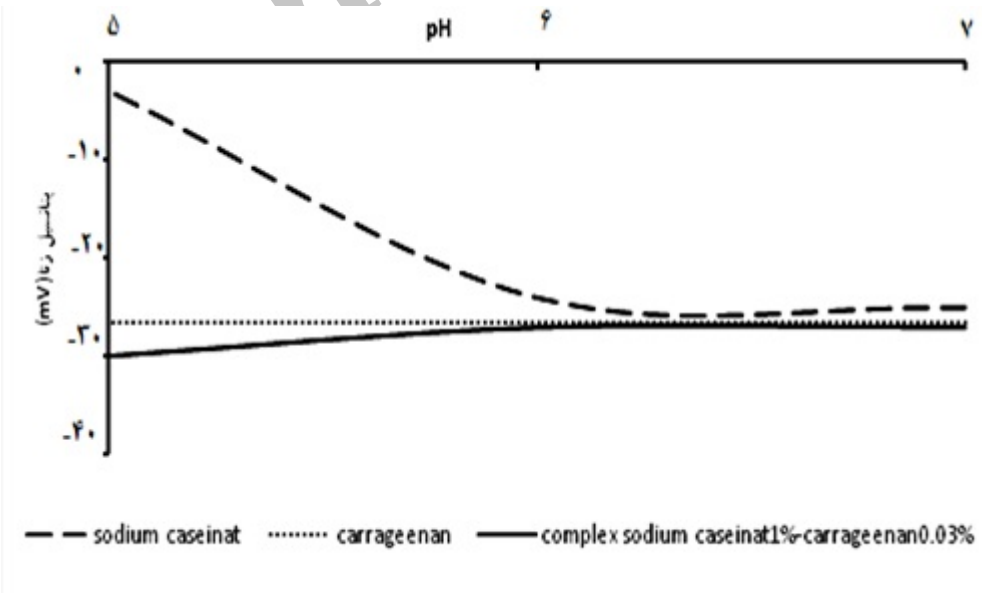
در یک سیستم کلوئیدی، اختلاف پتانسیل بین لایه‌ی یونی غیرمتحرک (لایه استرن) و لایه متحرک (لایه انتشار) در اتمسفر یونی اطراف ذرات باردار، پتانسیل زتا نامیده می‌شود. پتانسیل زتا بهترین شاخص برای تعیین وضعیت الکتریکی سطح ذرات است چون نشان‌دهنده‌ی میزان تجمع بار در لایه‌ی غیرمتحرک و شدت جذب یون‌های مخالف بر روی

www.SID.ir

سطح ذره است و بنابراین بار ذرات اغلب بر حسب پتانسیل زتا گزارش می‌شود. بالا بودن پتانسیل زتای ذرات کلوئیدی موجب بالا رفتن نیروی دافعه الکترواستاتیک و در نتیجه افزایش پایداری فیزیکی سیستم می‌شود. عوامل مختلفی از جمله pH، قدرت یونی، نوع و غلظت ماکرومولکول‌های پلی‌ساکاریدی و پروتئینی مورد استفاده، نسبت بین آن‌ها و ... بر روی میزان بار سطحی، تحرک الکتروفورتیک و پتانسیل زتای کمپلکس حاصل مؤثر است.

جهت بررسی تاثیر pH بر پتانسیل زتا، محلول کازئینات سدیم ۱٪ ، کاراگینان ۰/۰۳٪ و کمپلکس حاصل از این دو بیوپلیمر مورد بررسی واقع شد. همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، با کاهش pH از ۷ به ۵، بار منفی کازئینات، از ۲۵- به ۳- میلی‌ولت کاهش یافته است. در تحقیقی که توسط Ye و همکاران (۲۰۰۶) بر روی نانوکمپلکس کازئینات سدیم – صمغ عربی انجام دادند کاهش مشابهی مشاهده شد و پتانسیل زتای محلول کازئینات خالص ۰/۱ درصد، با کاهش pH از ۷ به ۲، از ۲۸- به ۲۵+ میلی‌ولت رسید.

پلی ساکارید های آنیونی در تمامی pH های بالای pKa دارای بار منفی هستند (pKa اکثر پلی‌ساکاریدها نزدیک ۳ است) اما بزرگی بار بستگی به نوع پلی‌ساکارید و pH دارد. بررسی اثر pH بر پتانسیل زتای پلی‌ساکارید کاراگینان نشان داد که مقدار پتانسیل زتای کاراگینان در گستره‌ی pH مورد بررسی (۷-۵)، ۲۶/۵- بود یعنی مقدار بار منفی کاراگینان در تمام گستره مورد تحقیق pH، ثابت بود که این به گروه آنیونی قوی روی پلی‌ساکارید (گروه سولفات) و مقادیر pKa پایین آن (۲/۵) می‌تواند نسبت داده شود (Peinado et al., 2010). تحقیقات Peinado و همکاران (۲۰۱۰) بر روی تولید کمپلکس لاکتوفرین با پلی ساکاریدهای آنیونی نشان داد که با کاهش pH، از ۱۱به ۲/۵ مقادیر پتانسیل زتای کاراگینان به دلیل داشتن قدرت یونی بالا ثابت باقی می‌ماند اما در مورد پکتین و آلژینات، مقادیر پتانسیل زتا از pH ۴ به پایین، تقریباً به صفر می‌رسد. این محققان این اختلاف را به تفاوت بین گروه‌های سولفاتی کاراگینان و کربوکسیلی پکتین و آلژینات مرتبط دانستند. در تحقیقات انجام شده توسط Ye و همکاران (۲۰۰۶) نیز مقدار پتانسیل زتای صمغ عربی در pH ۶/۴ تا ۴، ۲۶/۵- میلی‌ولت گزارش شد در حالی که با کاهش بیشتر pH، مقادیر منفی آن کاهش یافته و در نهایت در pH ۲ مقدار پتانسیل زتا به صفر رسیده و بار خالص آن خنثی می‌شود.



شکل ۴- پتانسیل زتای کازئینات، کاراگینان و کمپلکس کازئینات۱٪- کاراگینان ۰/۰۳٪

hive of SID

www.SID.ir

در pH=۵، پتانسیل زتای کمپلکس کازئینات سدیم–کاراگینان (۳۰-) میلی‌ولت، از مقادیر کاراگینان خالص (۲۶/۵-) میلی‌ولت و کازئینات سدیم (۳-) میلی‌ولت منفی تر است. مقدار بار روی کمپلکس شباهت زیادی به تعداد بار روی کاراگینان دارد که این نشان می‌دهد در لایه خارجی، کاراگینان غالب است. اندازه گیری پتانسیل زتا نشان دهنده این واقعیت بود که کاراگینان بخوبی می‌تواند جذب سطح کازئینها شود و با ایجاد نیروی دافعه منفی بالا، از توده شدن ذرات جلوگیری کند در نتیجه باعث کوچک ماندن اندازه ذرات گردد.

در تحقیقی که Jones و همکاران (۲۰۱۰) انجام دادند مقادیر پتانسیل زتای بتالاکتوگلوبولین در pH = ۴/۷۵ برابر ۷/۳- میلی‌ولت بود در حالی که در محلول بتالاکتوگلوبولین حاوی کاراگینان، پکتین کم استر و پراستر به ترتیب، ۵۷-، ۲۴-، ۴۶- (میلی‌ولت) گزارش شد و محلول خالص هر کدام از پلی‌ساکاریدها به تنهایی به ترتیب، مقدار پتانسیل زتای برابر با ۴۳-، ۴۵-، ۲۴- (میلی‌ولت) داشتند. از آنجایی‌که کمپلکس حاصله نسبت به هر کدام از بیوپلیمرها دارای مقدار بار بیشتر و در نتیجه دافعه‌ی الکتریکی بیشتر بود، انتظار بر این بود که محلول این کمپلکس‌ها پایداری بالاتری نسبت به محلول خالص بیوپلیمرها به‌صورت تنها داشته باشند.

بر خلاف این پژوهش، در برخی از تحقیقات، پتانسیل زتای کمپلکس، ما بین پتانسیل زتای پلی‌ساکارید و پروتئین قرار داشت. برای مثال در تحقیق Ye و همکاران (۲۰۰۶) مقدار پتانسیل زتا کمپلکس کازئینات سدیم–صمغ عربی در تمام pHها، مابین هرکدام از بیوپلیمرهای خالص قرار داشت. همچنین در نانوکمپلکس بتالاکتوگلوبولین– پکتین حامل اسیدهای چرب ω_3 (Livney & Zimet, 2009)، در نانوکمپلکس بتالاکتوگلوبولین–پکتین حامل مواد آب‌گریز در نوشیدنی‌های شفاف (Ron et al., 2010)، در کمپلکس لاکتوفرین-پکتین (Bengoechea et al., 2011)، مقدار پتانسیل زتای کمپلکس در تمامی pHها بین محلول خالص پروتئین و پلی‌ساکارید قرار داشت.

Harnsilwat و همکاران (۲۰۰۶b) در تحقیقی در خصوص پایدارسازی نوشیدنی‌ها از طریق برهم‌کنش الکترواستاتیک بتالاکتوگلوبولین و پلی‌ساکاریدهای کاراگینان، آلژینات و صمغ عربی، نشان دادند که در pH ۴، مقدار پتاسیل زتا محلول حاوی ۰/۱٪ کاراگینان، آلژینات و صمغ عربی به ترتیب برابر با ۵۱- ، ۵۵-، ۲۳- (میلی‌ولت) و در pH ۳ مقدار آنها به ترتیب ۵۳-، ۳۰-، ۹- (میلی‌ولت) می‌باشند و در pH ۴ و ۳ مقایر پتانسیل زتا در کمپلکس پروتئین با کاراگینان به ۵۰- میلی‌ولت، کمپلکس با آلژینات به ترتیب ۵۰- و ۲۶- (میلی‌ولت) و در کمپلکس با صمغ عربی مقدار آن به ترتیب به ۳۵- و ۱۹- (میلی‌ولت) رسید. این محققین چنین نتیجه‌گیری کردند که مقدار بار کمپلکس پروتئین – پلی‌ساکارید، به نوع پلی‌ساکارید بستگی زیادی دارد و مقادیر پتانسیل زتا در کمپلکس ممکن است نسبت به محلول‌های خالص پروتئین و پلی‌ساکارید افزایش یابد.

خواص رئولوژیکی

ویژگی‌های رئولوژیکی از مهمترین ویژگی‌های کیفی نوشیدنی‌ها محسوب می‌شود و ارتباط نزدیکی با ویژگی‌های ارگانولپتیکی و ساختاری دارد. این ویژگی‌ها از سویی بر پذیرش مصرف کننده تأثیر مستقیمی دارند و از سوی دیگر اطلاعاتی از ساختار و ویژگی‌های فیزیکی ذرات معلق به‌دست می‌دهند. نوع و شدت برهم‌کنش بین ذرات، اندازه و توزیع اندازه ذرات و ویژگی‌های ذرات توده شده، از پارامترهای مهم مؤثر بر ویژگی‌های رئولوژیک می‌باشند.

در آزمون رئولوژیکی پایا، رفتار جریانی کاراگینان با دو غلظت (۰/۰۱ و ۰/۰۳درصد) و کازئینات سدیم با سه غلظت متفاوت (۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد) در pH طبیعی محلول و همچنین کمپلکس‌های تشکیل شده در غلظت‌های مختلف این دو بیوپلیمر در pH = ۴/۹ مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور، مقادیر تنش برشی و ویسکوزیته به صورت تابعی از سرعت برشی (۲-۱۰۰ بر ثانیه) برای تعیین نوع رفتار جریانی نمونه‌ها اندازه‌گیری شد.

شکل ۵ رابطه خطی تنش برشی- سرعت برشی را در غلظت‌های مختلف کاراگینان و کازئینات (a) و همچنین کمپلکس حاصل از آن‌ها (b) را نشان می‌دهد و این رفتار حاکی از آن است که محلول‌ها

Archive of SID

www.SID.ir

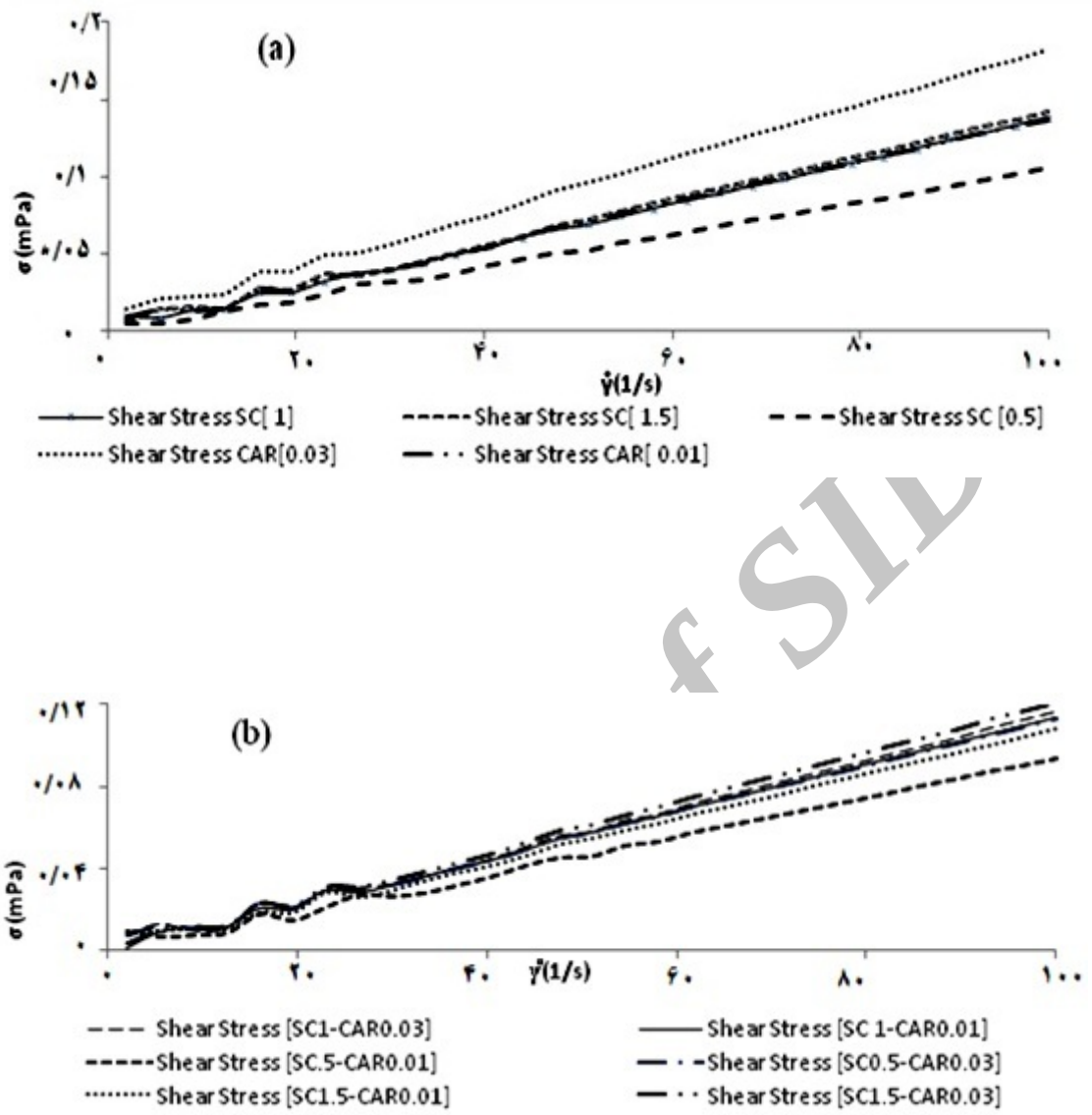
دارای ساده‌ترین رفتار جریانی، یعنی رفتار نزدیک به نیوتنی هستند. در این سیالات، شیب خط نمودار تنش برشی ـ سرعت برشی، ویسکوزیته نیوتنی را نشان می‌دهد.

شکل ۶ رابطه بین ویسکوزیته و سرعت برشی را برای نمونه‌ها نشان می‌دهد. در سرعت‌های برشی پایین (پایین‌تر از۲۰ بر ثانیه)، افت اولیه در مقدار ویسکوزیته مشاهده می‌شود که به تغییر شکل ذرات و نابودی برهم‌کنش‌های ضعیف بین آن‌ها، در نتیجه اعمال نیروی برشی، می‌تواند مربوط باشد. همچنین، نمودارهای ویسکوزیته- سرعت برشی نشان می‌دهد که ویسکوزیته به سرعت برشی وابسته نیست و با افزایش سرعت برشی، ثابت باقی می‌ماند. با توجه به شکل ۶- a، مشاهده می‌شود که محلول‌های کاراگینان در هر دو غلظت ۰/۰۱ و ۰/۰۳ درصد، نسبت به محلول‌های کازئینات، ویسکوزیته بیشتری دارند و غلظت ۰/۰۳٪ کاراگینان بالاترین ویسکوزیته را نشان می‌دهد. کاراگینان و کازئینات به دلیل داشتن گروه‌های آب‌دوست فراوان، به میزان زیادی آب جذب می‌کنند و افزایش درصد آنها سبب افزایش تعداد گروه‌های آب‌دوست و جذب بیشتر آب می‌شود. همیشه در دمای ثابت، رابطه مستقیم غیر خطی بین غلظت مواد محلول و ویسکوزیته وجود دارد و با افزایش غلظت مواد، ویسکوزیته افزایش می‌یابد. 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 نرسیده‌اند تا شاهد افزایش یک‌باره ویسکوزیته و ظهور رفتار سودوپلاستیک (روان شونده با برش) باشیم. در کسر حجمی بحرانی، زنجیرهای بیو پلیمرها گیر می‌افتند و ویسکوزیته به شدت افزایش می‌یابد.

در نمودار ویسکوزیته ـ سرعت برشی نمونه‌های کمپلکس (شکل ۶-b) مشاهده می‌شود که محلول‌های حاوی ۰/۰۳٪ کاراگینان، دارای ویسکوزیته بالاتری هستند و با کاهش غلظت کاراگینان، مقدار ویسکوزیته نمونه کمپلکس کاهش می‌یابد. افزایش غلظت کاراگینان می‌تواند با اثر بر توده شدن ذرات و همچنین ویسکوزیته فاز پیوسته، ویسکوزیته کلی سیستم کلوئیدی را تحت تأثیر قرار دهد. همیشه در یک کسر حجمی ثابت از فاز پراکنده، سیستم حاوی ذرات توده شده دارای ویسکوزیته بالاتری از سیستم حاوی ذرات توده نشده می‌باشند. با توجه به جدول ۲، در pH ۴/۹ و در غلظت های ۱و ۱/۵ درصد کازئینات، افزایش کاراگینان از ۰/۰۱ به ۰/۰۳ درصد موجب افزایش اندازه ذرات به ترتیب از ۷۴ به ۶۵۱ نانومتر و از ۱۷۷ به ۱۰۲۱ نانومتر گردیده است که به مکانیسم انبوهش ناشی از تشکیل پل[1] توسط کاراگینان نسبت داده شد. همان‌طور که گفتیم در غلظت‌های بالای پروتئین، در اثر افزایش غلظت کاراگینان، مکانیسم انبوهش ناشی از تشکیل پل کاراگینانی بین ذرات پروتئین، می‌تواند تشدید شود و در نتیجه توده شدن ذرات و به تبع آن ویسکوزیته افزایش یابد. همچنین کاراگینان جذب نشده در سطح کازئینات می‌تواند طی مکانیسم انبوهش ناشی از تهی شدن[2] موجب به هم پیوستن ذرات به هم و افزایش ویسکوزیته گردد (Dickinson, 1998). در غلظت ۰/۵ ٪ کازئینات، افزایش کاراگینان از ۰/۰۱ به ۰/۰۳ درصد موجب کاهش اندازه ذرات از ۱۳۹ به ۷۶ نانومتر گردید ولی باز شاهد افزایش ویسکوزیته بودیم که ممکن است این افزایش ویسکوزیته به حضور بخشی از کاراگینان در فاز پیوسته و در نتیجه افزایش ویسکوزیته فاز پیوسته مربوط باشد. بالاترین و پایین‌ترین ویسکوزیته به ترتیب مربوط به کمپلکس‌های ۰/۰۳٪کاراگینان- ۱/۵٪ کازئینات و ۰/۰۱٪ کاراگینان- ۰/۵٪ کازئینات بودند.

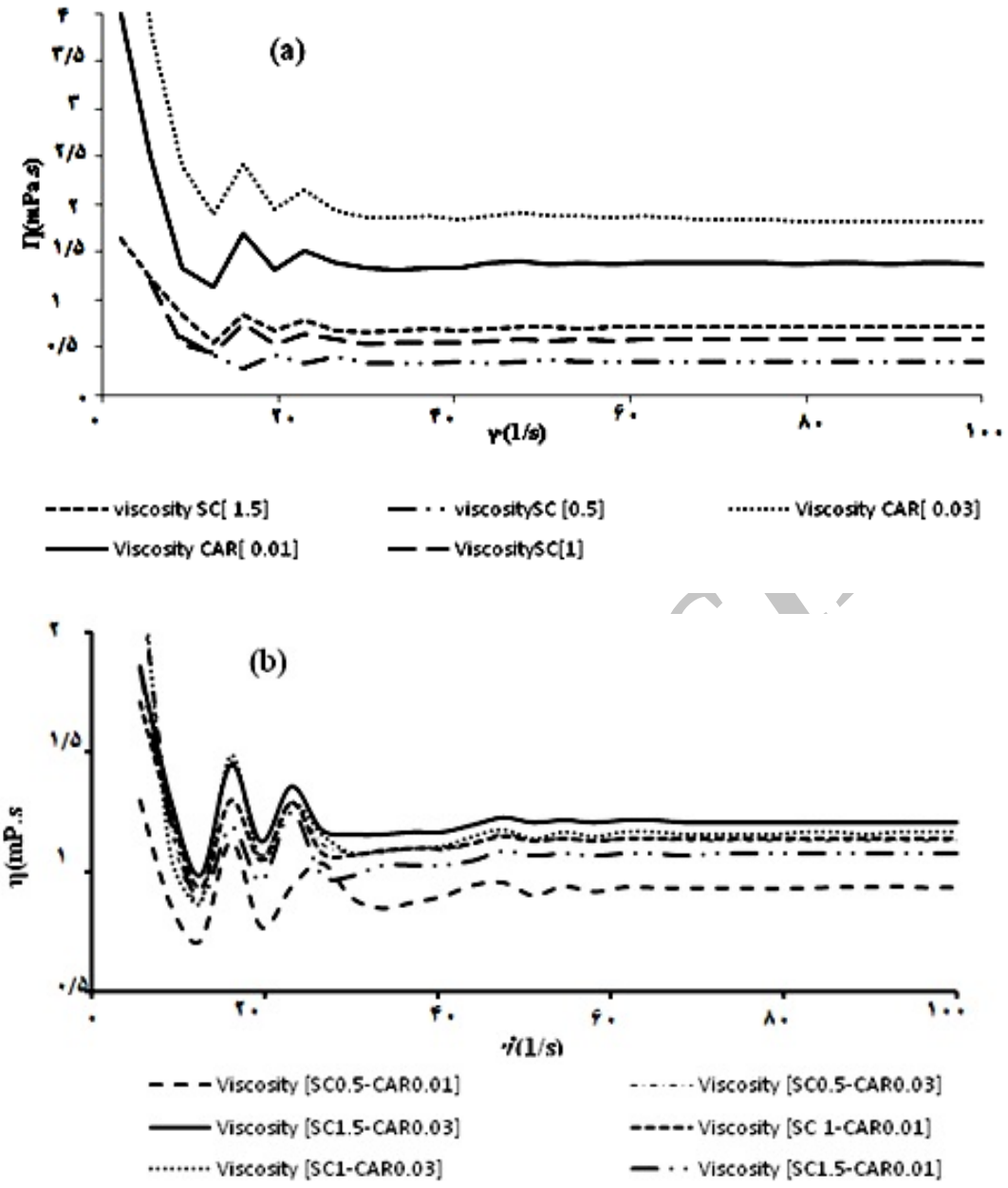
1-Bridging flocculation
2-Depletion flocculation

www.SID.ir



شکل ۵- نمودار تنش برشی ـ سرعت برشی برای نمونه‌ها ی حاوی غلظت‌های متفاوت (a) کازئینات سدیم (۰/۵٪، ۱٪ و ۱/۵٪) و کاراگینان (۰/۰۱٪ و ۰/۰۳٪) و (b)کمپلکس بین آن‌ها در pH= ۴/۹ (کازئینات سدیم = SC، کاراگینان= CAR).

www.SID.ir



شکل ۶- نمودار ویسکوزیته ـ سرعت برشی برای نمونه‌ها ی حاوی غلظت‌های مختلف (a)کازئینات سدیم (۰/۵٪، ۱٪ و ۱/۵٪) و کاراگینان (۰/۰۱٪ و ۰/۰۳٪) و (b)کمپلکس بین آن‌ها در pH= ۴/۹ (کازئینات سدیم = SC، کاراگینان=CAR).

یکی از مدل‌هایی که برای تفسیر رفتار رئولوژیکی مورد استفاده قرار می‌گیرد، مدل قانون توان می‌باشد. در جدول ۳ مقادیر شاخص جریان (n) و ضریب قوام (k) به‌دست 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٪ بوده که نشان دهنده مناسب بودن مدل قانون توان برای توصیف خصوصیات جریانی کازئین وکاراگینان 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 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

www.SID.ir

کاراگینان، 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 روان شونده با برش، جایگزین رفتار نیوتنی می‌شود. با توجه به جدول ۳ مشاهده می‌شود که نمونه‌های کمپلکس بر رفتار رئولوژیکی سیستم بی‌تأثیر بوده و برای استفاده در نوشیدنی‌های رقیق مناسب می‌باشند. Hasheminya و همکاران (۲۰۱۰) در گزارشی اثر ایجاد برهم‌کنش بین پروتئین‌های 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 شاخص جریان می‌شود.

جدول ۳- پارامترهای محاسبه شده مربوط به مدل قانون توان برای نمونه‌ها، شامل اندیس جریان، اندیس قوام و R^2

کازئینات سدیم (٪)	کاراگینان (٪)	شاخص جریان n	ضریب قوام K (mPa.s)	R^2
۰/۵	۰	۰/۹۴۴۸	۱/۲۸۳۲	۰/۹۶۲۱
۱	۰	۰/۸۵۳۶	۱/۷۹۳۹	۰/۹۷
۱/۵	۰	۰/۸۴۵۵	۲/۵۱۳۶	۰/۹۴۷۴
۰	۰/۰۱	۰/۹۹۲۰	۱/۴۲۵	۰/۹۹۷۲
۰	۰/۰۳	۰/۹۳۴۹	۲/۴۴۱	۰/۹۹۶۴
۰/۵	۰/۰۱	۰/۸۷۹۳	۱/۰۱۴	۰/۹۹۴۳
۰/۵	۰/۰۳	۰/۹۸۷۹	۱/۱۹۲	۰/۹۹۵۸
۱	۰/۰۱	۱/۰۱۱	۱/۰۱۴	۰/۹۹۸۳
۱	۰/۰۳	۱/۰۱	۱/۱۱۴	۰/۹۹۵۳
۱/۵	۰/۰۱	۱	۱/۰۶	۰/۹۹۷۳
۱/۵	۰/۰۳	۱/۰۱۶	۱/۰۱۱	۰/۹۹۸۲

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.

Yane و همکاران (۲۰۰۲) تأثیر دو نوع هیدروکلوئید را بر شیر اسیدی مورد مطالعه قرار دادند. نتیجه اینکه تأثیر مقادیر مختلفی از کاراگینان (۰/۰۱، ۰/۰۲، ۰/۰۳، ۰/۰۴و ۰/۰۵) درصد در شیر اسیدی مشخص کرد که تا غلظت‌های ۰/۰۳ درصد از کاراگینان، تغییری در شرایط جریان ماده ایجاد نمی‌شود و سیال خصوصیت نیوتنی از خود نشان می‌دهد اما در غلظت‌های بالاتر کاراگینان، به دلیل اینکه ساختار ژلی ضعیفی در نمونه‌ها ایجاد می‌شود در ویژگی‌های جریان تغییر و به حالت سودوپلاستیک در می‌آید.

نتیجه‌گیری کلی

نسبت دو بیوپلیمر و pH، محلول‌های حاوی کازئینات و کاراگینان، نقش مهمی در اندازه ذرات کمپلکس‌های حاصل از آن‌ها دارد و معمولاً با افزایش نسبت کازئینات، اندازه ذرات افزایش و با افزایش نسبت کاراگینان بسته به pH ، هم افزایش و هم کاهش ممکن است رخ دهد. اندازه گیری‌های پتانسیل زتا نشان داد که کاراگینان با افزایش پتانسیل منفی دور ذرات کازئینات، نقش مهمی را می‌تواند در پایداری آنها ایفا کند. در غلظت‌های مورد استفاده بیوپلیمرها، تمامی محلول‌ها رفتار نیوتنی نشان می‌دهند ولی ویسکوزیته به شدت تحت تأثیر مقدار کاراگینان می‌باشد.

Archive

www.SID.ir

منابع

1. Aiqian, Y. 2008. Complexation between milk proteins and polysaccharides via electrostatic interaction. International Journal of Food Science and Technology, 43: 406–415.
2. Anal, A., 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.
3. Bengoechea, C., Jones, G. O., A, G. A. & McClements, D. J. 2011. Formation and characterization of lactoferrin/pectin electrostatic complexes: Impact of composition, pH and thermal treatment. Food Hydrocolloids, 25: 1227-1232.
4. Dickinson, E. 1998. Stability and rheological implications of electrostatic milk protein - polysaccharide interactions. Trends in Food Science & Technology, 9: 347- 354.
5. Goh, K. T. K., Sarkar, A. & Singh, H. 2008. Milk protein– polysaccharide interaction. Thompson, A., Boland, M. & Singh, H. (Ed), Milk proteins: from expression to food. (Vol. 5). (pp. 347-368). Academic Press is an imprint of Elsevier.
6. Grenha, A., Gomes, E. M., Rodrigues, M., Santo, V., Mano, J., Neves, N. & Reis, R. 2009. Development of new chitosan/carrageenan nanoparticles for drug delivery applications. Journal of Biomedical Materials Research, 1265- 1272.
7. Hasheminya, S. M., Ebrahimzadeh-Mousavi, S. M. A., Ehsani, M. R. & Dehghannya, J., 2011. Effect of gellan hydrocolloid on rheological properties and stabilization of a fiber-enriched Doogh. Iranian Food Science and Technology Research Journal, 21(2): 179-193.
8. Harnsilawata, T., Pongsawatmanita, R. & McClements, D. J., 2006 a. Characterization of b-lactoglobulin–sodium alginate interactions in aqueous solutions: A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study. Food Hydrocolloids, 20: 577–585.
9. Harnsilawata, T., Pongsawatmanit, R. & Mcclements, D. J. 2006 b. Stabilization of Model Beverage Cloud Emulsions Using Protein–Polysaccharide Electrostatic Complexes Formed at the Oil Water Interface. Food Chemistry, 54(15): 5540-5547.
10. Honary, S., Maleki, M. & Karami M. 2009. The effect of chitosan molecular weight on the properties of alginate/chitosan microparticles containing prednisolone, Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 8(1): 53-61.
11. Imeson, A. P. 2009. Carrageenan and furcellaran. Phillips, G. O. & Williams, P .A(Ed), Handbook of hydrocolloids: (Vol. 7). (pp. 148-168). Woodhead Publishing India Private Limited.
12. Jones, O., Andrew, E. D. & McClements, D. J. 2010. Thermal analysis of b-lactoglobulin complexes with pectins or carrageenan for production of stable biopolymer particles. Food Hydrocolloids, 24: 239–248.
13. 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.
14. Luo, Y., Zhang, B., Whent, M., Yu, L. & Wang, Q. 2011. Preparation and characterization of zein/chitosan complex for encapsulation of α-tocopherol, and its in vitro controlled release study. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 85: 145–152.
15. Medina-Torres, L. 2000. Rheological properties of the mucilage gum. Food Hydrocolloids, 14: 417-424.
16. Peinado, I. Lesmes, U., Andres, A. & McClements, D. J. 2010. Fabrication and morphological characterization of biopolymer particles formed by electrostatic complexation of heat treated lactoferrin and anionic polysaccharides. Langmuir, 26(12): 9827-34.
17. Ron, N., Zimet, P., Bargarum, J. & Livney, Y. D. 2010. Beta-lactoglobulinepolysaccharide complexes as nanovehicles for hydrophobic nutraceuticals in non-fat foods and clear beverages. International Dairy Journal, 20: 686-693.
18. Santinho, J. P. A., Pereira, L. N., Freitas, O. & Collett, H. J. 1999. Influence of formulation on the physicochemical properties of casein microparticles, International Journal of Pharmaceutics, 186: 191–198.
19. Sarblooki, M. 1995. Practical of Organic Chemistry, Publication of Jihad.

Archive of SID

www.SID.ir

20. Semo, E., Kesselman, E., Danino, D. & Livney, Y. D. 2007. Casein micelle as a natural nanocapsular vehicle for nutraceuticals. Food Hydrocolloids, 21: 936–942.
21. Turgeon, S. L. & Laneuville, S. I. 2006. Protein polysaccharide coacervates and complexes: From scientific background to their application as functional ingredients in food products. Kasapis, S., Norton, T. I. & Ubbink, B. J. (Ed), Modern Biopolymer Science, (Vol. 11). (pp. 339-342). Elsevier Inc.
22. *Wanchoo, R. K.,* Sharma, S. K. & Bansal, R. 1996. Rheological parameters of some water-soluble polymers. Polymer Materials, 13: 49- 55.
23. Yanes, M., Duran, L. & Costell, E. 2002. Effect of hydrocolloid type and concentration on flow behavior and sensory properties of milk beverage model system. Food hydrocolloids, 16: 605- 611.
24. Ye, A., Flanagan, J. & Singh, H. 2006. Formation of stable nanoparticles via electrostatic complexation between sodium caseinate and gum arabic. Biopolymers, 82: 121–133.
25. Zimet, P. & Livney, D. Y. 2009. Beta-lactoglobulin and its nanocomplexes with pectin as vehicles for ω-3 polyunsaturated fatty acids. Food Hydrocolloids, 23: 1120–1126.
26. Zimet, P., Rosenberg, D. & Livney Y. D. 2011. Re-assembled casein micelles and casein nanoparticles as nano-vehicle for ω -3 polyunsaturated fatty acids. Food Hydrocolloids, 25: 1270-1276.

Archive of SID

www.SID.ir

Investigation of effective parameters on particle size, zeta potential and steady rheological properties of colloidal system based on carrageenan-caseinate nanoparticles

M. Khoshmanzar[1], B. Ghanbarzadeh[2]*, H. Hamishekar[3]*, M. Sowti[4], R. Rezayi Mokarram[4]

1- MSc. student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz
2- Associated professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz
*Corresponding author (ghanbarzadeh@tabrizu.ac.ir, babakg1359@yahoo.com)
3- Assistant professor, Department of Pharmaceutical Sciences, Pharmaceutical Technology Laboratory, Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences
4- Assistant professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz

Abstract

Biopolymer-based nanocomplexes could be produced by electrostatic interactions between opposite-charge-groups on two types of biopolymers. In this research, the production method and properties of the kappa carageenan-caseinate based nanocomplex were investigated. The particle sizes of carageenan-caseinate complexes were vigorously dependent to pH and biopolymers concentrations and optimum level was observed for both of these factors. The sizes of the smallest particles were 74 and 75 nanometers which were obtained at pH=4.9 and concentrations of 1% caseinate-0.03% carageenan and 0.5% caseinate-0.02% carageenan, respectively. Reduction of pH from 5.3 to 5.1, caused decrease of particle size in all samples and continuing pH reduction to 4.9 caused more reduction of particle size at low concentration of caseinate. The zeta potential data showed that the amount of negative charges in complexes were higher than sum of charges in both biopolymers. All pure and complex samples showed Newtonian behavior and increasing both biopolymer concentrations enhanced viscosity of complex.

Keywordes: Carageenan; Caseinate; FTIR; Nanocomplexes; Particle size

Archive of SID

www.SID.ir