



نانو کمپلکس‌های ژلان-کازئینات به‌عنوان حامل اسیدهای چرب امگا سه: بررسی اندازه ذرات، رئولوژی و کارایی انکپسولاسیون

چیا عزیزانباری^۱، بابک قنبرزاده^{۲*}، حامد همیشه کار^۳ و محمدیار حسینی^۴

^۱دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشگاه تبریز، دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه تبریز، ^۲استادیار مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، ^۳کارشناس ارشد صنایع غذایی مرکز تحقیق و توسعه شرکت تکدانه، مرند
تاریخ دریافت: ۹۱/۰۷/۲۵؛ تاریخ پذیرش: ۹۲/۰۷/۱۲

چکیده

نانو کمپلکس‌های بیوپلیمری، دسته‌ای از نانو حامل‌ها هستند که بیشتر با استفاده از برهم کنش‌های بین پلی ساکاریدها و پروتئین‌ها تولید می‌شوند. آنها توانایی حمل، حفاظت و افزایش دسترسی زیستی مواد غذا- داروی آب‌گریز در محلول‌های آبی را دارند. در این تحقیق، کمپلکس‌های ژلان-کازئینات حاوی امگا سه، با افزودن محلول‌های ژلان به سیستم کازئینات حاوی امگا سه و تنظیم pH به زیر نقطه ایزوالکتریک کازئینات ($PI=4/9$) تولید شدند. با افزایش غلظت کازئینات از ۰/۱ به ۰/۵ و سپس ۱ درصد، در غلظت ثابتی از صمغ ژلان، اندازه ذرات بصورت پیوسته افزایش یافت و افزودن صمغ ژلان به محلول‌های کازئینات در دو غلظت ۰/۰۵ و ۰/۱ درصد، موجب کاهش اندازه ذرات گردید. در غلظت‌های ۰/۱ درصد ژلان و کازئینات، کوچک‌ترین ذرات (۳۸۵ نانومتر) تشکیل شدند و قطر بیش از ۵۰ درصد ذرات، زیر ۳۷۲ نانومتر و بیش از ۹۰ درصد ذرات زیر ۱۱۷۰ نانومتر بودند. آزمون کدورت‌سنجی نشان داد که با افزایش غلظت ژلان از ۰/۰۵ به ۰/۱ درصد، کدورت کاهش می‌یابد که به کاهش اندازه ذرات نسبت داده شد. نتایج رئومتری نشان داد که کمترین ویسکوزیته در نمونه‌های با ژلان ۰/۱ درصد و بیشترین ضریب قوام، رفتار روان شونده با برش و مدول‌های ویسکوالاستیک در نمونه‌های با ژلان ۰/۰۵ درصد قابل مشاهده است. مطابق نتایج آنالیز با کروماتوگرافی گازی، با افزایش کازئینات و ژلان، درصد درون پوشانی به‌ترتیب کاهش و افزایش می‌یابد و بالاترین میزان سطح درون‌پوشانی در نمونه با کازئینات ۰/۱-ژلان ۰/۱ درصد مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: کمپلکس ژلان-کازئینات، انکپسولاسیون، غذا-دارو، اندازه ذرات، رئولوژی

*مسئول مکاتبه: ghanbarzadeh@tabrizu.ac.ir

مقدمه

اسیدهای چرب امگا سه، دسته‌ای از اسیدهای چرب چند غیر اشباعه (معمولاً بیش از دو پیوند دو گانه) می‌باشند که پیش‌ساز بسیاری از ترکیبات ضروری در بدن بوده و در حفظ سلامت سیستم قلبی و عروقی، سیستم ایمنی و پوست نقش به‌سزایی دارند (سمو و همکاران، ۲۰۰۷؛ زیمت و همکاران، ۲۰۰۹). مهم‌ترین اسیدهای چرب امگا سه عبارت از اسیدلینولنیک، اسیدایکوزا پنتونئیک (EPA) و اسید دوکوزا هگزانوئیک (DHA).

انکپسولاسیون^۱ (درون پوشانی) به فرایندی گفته می‌شود که در آن یک ماده زیست فعال (مانند مواد مغذی، طعمی، دارویی و غذا-دارو (نوتریسیوتیکال)^۲ توسط یک ماده دیگر (از جنس بیو پلیمر، پلیمر سنتزی یا ترکیبات لیپیدی) پوشش داده می‌شود (ندوویکا و همکاران، ۲۰۱۱؛ هاریس و همکاران، ۲۰۱۱). واژه نانو انکپسولاسیون از میکرو انکپسولاسیون منشأ گرفته است که در سال‌های اخیر برای اهداف مختلف از جمله حفاظت در برابر عوامل بیرونی (نور، حرارت، اکسیژن، فلزات سنگین، آنزیم‌ها)، افزایش زیست دسترسی^۳ و حلالیت در آب و نوشیدنی‌های آبی در صنایع دارویی و غذایی به‌کار برده می‌شود ولی ابعاد ذرات در نانوکپسولاسیون کمتر از ۱۰۰ نانومتر هستند (چن و همکاران، ۲۰۰۶؛ فنگ و همکاران، ۲۰۱۰؛ زویدم و همکاران، ۲۰۱۰). کاهش اندازه ذرات باعث می‌شود، زیست دسترسی و شفافیت محلول‌های حاوی ذرات کم محلول در آب مانند اسیدهای چرب امگا سه، کارتنوئیدها و ویتامین‌های محلول در چربی بیشتر شود (چاودری و همکاران، ۲۰۱۰؛ فنگ و همکاران، ۲۰۱۰).

انواع مختلفی از پروتئین‌ها و پلی ساکاریدها به‌تنهایی یا به‌صورت کمپلکس می‌توانند برای تولید نانو حامل‌های بیوپلیمری به‌کار روند (چن و همکاران، ۲۰۰۶؛ جانز و همکاران، ۲۰۱۰؛ لو و همکاران، ۲۰۱۱؛ متالانیز و همکاران، ۲۰۱۱؛ زویدم و همکاران، ۲۰۱۰). هنگامی که پروتئین و پلی ساکارید، در یک محیط مایع با هم مخلوط می‌شوند دو وضعیت مختلف می‌تواند بین دو بیوپلیمر رخ دهد: غلبه برهم‌کنش‌های جذبی و در نتیجه تشکیل کمپلکس‌های محلول و نامحلول و یا غلبه بر هم‌کنش‌های دفعی و در نتیجه جدا شدن دو بیوپلیمر از هم و قرار گرفتن به‌صورت مجزا. بسته به بار الکتریکی موجود بر روی هر دو بیوپلیمر و همچنین فاکتورهای موثر بر آنها مثل pH و قدرت یونی یکی از این

- 1- Encapsulation
- 2- Nutraceuticals
- 3- Bioavailability

دو رخ خواهد داد. برهم کنش‌های جذبی، بیشتر از طریق ایجاد پیوندهای الکترواستاتیک بین بارهای مخالف بیوپلیمرها صورت می‌گیرد و بین پروتئین‌های با بار مثبت در زیر نقطه ایزوالکتریک ($pH < pI$) و پلی‌ساکاریدهای آنیونیک (حاوی گروه‌های کربوکسیل، فسفات و سولفات) در pH بالای pK_a ؛ و یا پروتئین با بار منفی ($pH > pI$) و پلی‌ساکاریدهای کاتیونیک (مانند کیتوزان) رخ می‌دهد (ماتالانیز و همکاران ۲۰۱۱).

(تولید توسط باکتری *Sphingomonas elodea*) و آنیونی بوده و از تکرار یک تتراساکارید شامل سه واحد بتا گلوکوپیرانوز با اتصالات ۱ به ۴ و یک واحد بتا رامنوپیرانوز تشکیل شده است و گروه‌های گلیسیریل و استیل به ترتیب در کربن شماره ۲ و ۶ گلوکز سوم جایگزین می‌شوند.

کازئین مهم‌ترین پروتئین شیر نشخوارکنندگان بوده و در شیر، میسل‌هایی تشکیل می‌دهد که به‌عنوان یک نانوحامل طبیعی عمل می‌کنند. کازئینات سدیم، یکی از مشتقات کازئین می‌باشد که به‌صورت صنعتی تهیه شده و کاربردهای فراوانی در صنایع غذایی دارد. کازئین و کازئینات می‌توانند با برهم کنش‌های مختلف شامل الکترواستاتیک و هیدروژنی به پلی‌ساکاریدها و مواد زیست فعال آب‌گریز (مانند امگا سه) توسط برهم کنش‌های آب‌گریز متصل شوند (به‌صورت مدل پوسته-هسته) (جانز و همکاران، ۲۰۱۰؛ سمو و همکاران، ۲۰۰۷، سنتینهو و همکاران ۱۹۹۹ و زیمت و همکاران ۲۰۰۹). در پژوهشی، نتایج نشان داد که استفاده از میسل‌های کازئینی به عنوان نانو حامل ویتامین D_3 ، می‌تواند موجب افزایش بقا ویتامین در برابر نور UV، به اندازه ۲۷ درصد گردد (سمو و همکاران ۲۰۰۷).

در سال‌های اخیر، پژوهش‌های متعددی روی ویژگی‌های نانوحامل‌های تولید شده از کمپلکس‌های پلی‌ساکارید- پروتئین، انجام شده است (لیونی و همکاران، ۲۰۱۰؛ رلکین و همکاران، ۲۰۱۲؛ تورگون و همکاران، ۲۰۰۶؛ زیمت و همکاران، ۲۰۱۱). در پژوهشی، از کمپلکس کازئینات سدیم و صمغ عربی زیر $pH=5/4$ ، نانو ذراتی با اندازه ۱۰۰ تا ۲۰۰ نانومتر تولید شد که اندازه این ذرات در حین تغییرات pH ، ثابت باقی ماند در حالی که اندازه ذرات حاصل از کازئینات خالص، در اثر توده شدن، افزایش یافت (یه و همکاران، ۲۰۰۸). در تحقیقی دیگر، نتایج نشان داد که انکپسولاسیون اسید دکوزاهگزانوئیک (DHA) توسط کمپلکس بتالاکتوگلوبولین- پکتین، موجب کاهش افت آن از ۸۰ درصد به ۵-۱۰ درصد، در طی ۱۰۰ ساعت نگهداری در ۴۰ درجه سانتی‌گراد، گردید (زیمت و همکاران ۲۰۱۱). ران آ و همکاران

1- *Sphingomonas elodea*

2- Ron

از کمپلکس کردن بتالاکتوگلوبولین و پکتین متوکسیل پایین، سیستم نانوحامل شفاف و پایداری با اندازه ۵۰-۷۰ نانومتر (در pH=۴/۵) برای ویتامین D_۲ تولید کردند که باعث محافظت چند برابری از ویتامین در مقابل تجزیه شد و برای غنی سازی نوشیدنی های شفاف اسیدی و فاقد چربی بسیار مناسب بود. اندازه ذرات این سیستم به شدت وابسته به غلظت پکتین و pH بود (ران و همکاران، ۲۰۱۰).

با توجه به کارهای کتابخانه ای انجام شده، در مورد استفاده از کمپلکس های بر پایه ژلان برای تولید نانوکپسول تاکنون پژوهشی انجام نشده است. بنابراین در این تحقیق، نانوحامل ژلان-کازئینات حاوی امگا سه، از طریق مکانیسم تشکیل کمپلکس محلول (کواسرواسیون)^۱ تولید شد و ویژگی های فیزیکوشیمیایی آن مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

مواد: اسید چرب امگا سه (نوع ۶۰۰۰ از شرکت داروسازی دانای تبریز)، سدیم کازئینات (۸۸ درصد پروتئین، CP Kelco Co, USA) و ژلان با آسیل بالا (CP Kelco Co, USA)، نمک های تری پتاسیم سترات، دی پتاسیم هیدروژن فسفات، کلرید کلسیم، استون، اسید کلریدریک و هیدروکسید سدیم (Merck Chemical Co., Germany) تهیه شدند.

تهیه محلول های ژلان: برای تهیه محلول های ۰/۵ و ۰/۱ درصد ژلان، در ابتدا آب دو بار تقطیر توسط هیتر تا ۷۰ درجه سانتی گراد-۸۰ درجه سانتی گراد حرارت داده شد و سپس پودر ژلان در مقادیر تعیین شده، همراه با هم زدن مداوم، به آب افزوده شد. سپس به منظور کاهش دما، محلول ها به مدت ۱-۱/۵ ساعت، در دمای محیط نگهداری شده و به منظور کامل شدن جذب آب، حداقل به مدت ۸ ساعت قبل از استفاده، در یخچال نگهداری شدند.

تهیه محلول های کازئینات سدیم: برای تهیه محلول های کازئینات ۰/۵ درصد، ۰/۱ درصد و ۱ درصد، آب دوبار تقطیر در حمام آبی تقریباً ۴ درجه سانتی گراد حاوی یخ قرار داده شد و پودر کازئینات سدیم به تدریج به آن اضافه گردید و به ملایمت توسط هم زن مغناطیسی با دور پایین به هم زده شد تا حل شود (کاهش دما موجب کاهش لخته شدن می شود و باید از هم زدن توسط قاشق خودداری گردد). محلول ها

به مدت ۸ ساعت در دمای یخچال نگهداری شدند تا جذب آب توسط پروتئین به حداکثر مقدار خود برسد. سپس محلول‌ها از کاغذ فیلتر واتمن ۱ ۴۰ با استفاده از پمپ خلاء عبور داده شدند.

تهیه محلول حاوی امگا سه: ۰/۷۵ سی سی از مخلوط روغنی حاوی اسیدهای چرب امگا سه DHA و EPA در ۲۵ سی سی حلال اتانول گرم (۶۰ درجه سانتی‌گراد) افزوده و به مدت ۱۵ دقیقه مخلوط شد. برای جلوگیری از اکسید شدن اسیدهای چرب ظرف نگهداری با فویل آلومینیومی پوشانده شد.

طرز تهیه کمپلکس ژلان-کازئینات حاوی امگا سه: مقدار ۲۰ سی سی محلول امگا سه به ۱۰۰ سی سی از محلول‌های کازئینات افزوده شد و به مدت ۵ دقیقه به شدت به هم زده شد تا امگا سه به پروتئین متصل شود. سپس، ۲ سی سی تری پتاسیم سیترات ۰/۴ مولار به محلول افزوده شد و در ادامه دو محلول نمکی کلرید کلسیم ۰/۰۸ مولار و دی پتاسیم هیدروژن فسفات ۰/۰۸ مولار طی ۶ مرحله و هر بار ۲ سی سی در فاصله زمانی ۱۵ دقیقه توسط سرنگ به محلول اضافه شدند. در این مرحله، پس از رساندن محلول به حجم مورد نظر و تنظیم pH در حالت خنثی، محلول ژلان به صورت قطره‌ای و بصورت ۲۵ سی سی به ازای ۲۵ سی سی کازئینات، به محلول پروتئینی افزوده شد و تیتراسیون با HCL ۰/۱ نرمال انجام شد (یه و همکاران ۲۰۰۸ و زیمت و همکاران ۲۰۱۱). محلول‌ها در pH=۵/۲ شروع به کدر شدن کردند که نشان‌دهنده تشکیل کمپلکس بود و در نهایت در pH=۴/۹ محلول‌ها شروع به رسوب کردن نمودند.

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

میانگین قطر حجمی (میانگین حجم معادل) از معادله زیر محاسبه شد:

$$\bar{D}[\xi, \nu] = \frac{\sum n_i d_i^\xi}{\sum n_i d_i^\nu} \quad \text{معادله (۱)}$$

توزیع اندازه ذرات با استفاده از معادله زیر محاسبه شد:

$$\text{Span} = \frac{D(90\%) - D(10\%)}{D(50\%)} \quad \text{معادله (۲)}$$

(۹۰ درصد) D: قطری که حجم ذرات کوچکتر از آن، ۹۰ درصد حجم کل ذرات موجود در سیستم را تشکیل می‌دهد.

(۵۰ درصد) D: قطری که حجم ذرات کوچکتر از آن، ۵۰ درصد حجم کل ذرات موجود در سیستم را تشکیل می‌دهد (قطر میانه). (۱۰ درصد) D: قطری که حجم ذرات کوچکتر از آن، ۱۰ درصد حجم کل ذرات موجود در سیستم را تشکیل می‌دهد. میزان اسپین کمتر، نشان‌دهنده یکنواختی بیشتر در توزیع اندازه ذرات می‌باشد.

تعیین کدورت: اندازه‌گیری‌های مربوط به کدورت نمونه‌ها در دستگاه کدورت سنج (مدل 2100P Turbidimeter، آلمان) انجام شد.

تعیین مقادیر امگا سه: آنالیز متیل استرهای اسیدهای چرب با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی (مدل QP2010-Plus شرکت شیماتزو، ژاپن) مجهز به دتکتور اسپکترومتری جرمی و ستون Sol Gel-1ms با طول ۳۰ متر و قطر ۰/۳۲ متر انجام شد. اسیدهای چرب، با مقایسه پیک‌های حاصله و زمان احتباس مربوطه با مقادیر متناظر اسیدهای چرب استاندارد شناسایی شد و مقادیر آن‌ها از طریق مقایسه مساحت زیر پیک اسیدهای چرب نمونه و استاندارد داخلی تعیین گردید. برای تهیه محلول استاندارد داخلی، ۵۰ میلی‌گرم هپتادکانوئیک اسید با استون در بالون ژوژه به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. پس از آن به مدت ۱۰ دقیقه در آن ۶۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا به‌طور کامل در حلال استون حل شود. برای استخراج امگا سه از پودرهای کمپلکس، ۲۰ میلی‌گرم پودر کمپلکس به مدت ۱۰ دقیقه در ۵ میلی‌لیتر استون قرار گرفت و به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ (۲۰۰۰ rpm و توان ۴۰ وات) شد. محلول رویی حاوی امگا سه، از مواد جامد ته‌نشین شده (کمپلکس کازئینات-پکتین) جدا شد. محلول استون حاوی امگا سه تا حجم نهایی ۱ سی‌سی تبخیر شده و به لوله‌های ویال منتقل شد (این کار به‌منظور تغلیظ نمونه امگا سه و آنالیز بهتر آن انجام گرفت). برای مشتق‌سازی، ۱ میلی‌لیتر کمپلکس بورتتری فلورید متانول به آن اضافه شد و به مدت ۴۵ دقیقه در آن ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا تغییر رنگ دهد. پس از سرد شدن نمونه‌ها، ۱ میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم ۲ نرمال افزوده شد تا pH آن به ۷ برسد (هیدروکسید سدیم از هیدرولیز شدن مجدد ترکیبات جلوگیری می‌کند) و در نهایت ۱ میلی‌لیتر n-هگزان به نمونه‌ها اضافه شد و پس از ۵ دقیقه سانتریفیوژ، فاز رویی به دقت جدا شده و به GC تزریق شد. برای تهیه نمونه استاندارد مقدار ۲۰ میلی‌گرم از روغن امگا سه با استون به حجم ۲۰ میلی‌لیتر رسید

و ۲ میلی‌لیتر از این محلول به لوله ویال منتقل شد. بقیه مراحل مشتق‌سازی همانند سایر نمونه‌های کمپلکس انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری: آزمون‌ها در سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شدند. تحلیل و ارزیابی (ANOVA) با استفاده از مدل خطی (G.L.M) نرم‌افزار آماری SPSS 16 (version 16.0 for Windows, SPSS Inc) در سطح احتمال ۵ درصد ($P < 0/05$) و آزمون چند دامنه‌ای دانکن برای تأیید وجود اختلاف بین میانگین‌ها انجام گرفت.

نتایج و بحث

اندازه ذرات و توزیع آنها: اندازه ذرات و توزیع آنها، نقش مهمی در ویژگی‌های فیزیکی سیستم‌های کلوئیدی مانند پایداری، کدورت و ویژگی‌های رئولوژیکی دارد. همچنین آن بر ویژگی‌هایی همانند دسترسی زیستی و خواص ارگانولپتیکی فرآورده غذایی کلوئیدی موثر است. همان‌طور که قبلاً اشاره شد، کاهش اندازه ذرات موجب افزایش نسبت سطح به حجم ذرات شده و بدین طریق بر ویژگی‌های فیزیکی، زیستی و حسی سیستم تأثیر می‌گذارد و بنابراین سیستم‌های حاوی ذرات در مقیاس نانو، دارای ویژگی‌های متفاوتی نسبت به سیستم‌ها در مقیاس میکرو، خواهند بود. عوامل مختلفی بر اندازه ذرات کمپلکس‌های پروتئین-پلی‌ساکارید می‌توانند موثر باشند که در این مطالعه اثر غلظت بیوپلیمرها مورد بررسی قرار گرفته است.

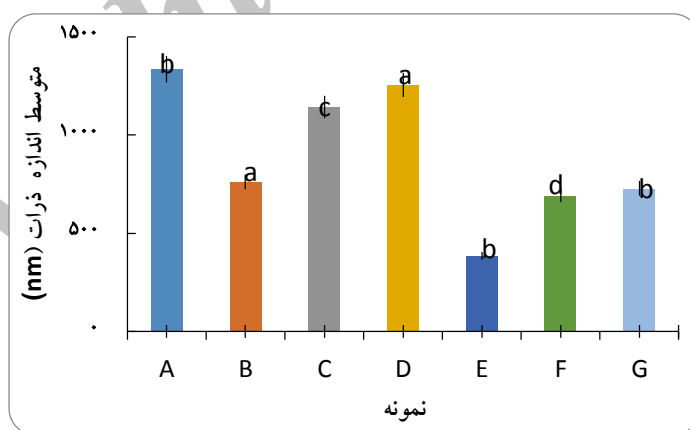
با توجه به شکل‌های ۱ و ۲ و جدول ۱، در غلظت ثابتی از صمغ ژلان، با افزایش غلظت کازئینات از ۰/۱ به ۰/۵ درصد و سپس ۱ درصد، اندازه ذرات به‌صورت پیوسته افزایش یافت. این موضوع می‌تواند به افزایش اتصالات بین زنجیری رشته‌های پروتئینی نسبت داده شود (هاشم‌نیا و همکاران، ۲۰۱۱). افزودن صمغ ژلان در دو غلظت ۰/۰۵ و ۰/۱ درصد موجب کاهش اندازه ذرات گردید البته این اثر کاهش‌دهنده در غلظت بالاتر ژلان (۰/۱ درصد) بیشتر مشهود بود. احتمالاً با افزودن صمغ ژلان و اتصال آن به ذرات کازئینی، نیروی دافعه الکترواستاتیک و ممانعت فضایی اطراف ذرات افزایش می‌یابد و در نتیجه از بهم پیوستن ذرات و افزایش اندازه آنها جلوگیری به‌عمل می‌آید.

در غلظت‌های پایین ژلان، مقادیر این نیروهای دافعه کمتر است و اندازه ذرات در غلظت ثابت ژلان، بستگی به غلظت کازئینات نیز دارد به‌طوری‌که در غلظت ۰/۰۵ درصد ژلان و غلظت ۰/۱ درصد کازئینات، اندازه نیروهای دافعه برای کوچک ماندن ذرات در مقیاس زیر ۵۰۰ نانومتر نسبتاً کافی به‌نظر

می‌رسد ولی با افزایش غلظت کازئینات، احتمالاً غلظت ژلان برای پوشاندن سطح کازئینات کافی نبوده و به مقادیر بیشتری از آن مورد نیاز است به طوری که در غلظت‌های ۰/۱ درصد ژلان و کازئینات، کوچک‌ترین نانوکمپلکس‌ها (۳۸۵ نانومتر) تشکیل شدند. در مورد تیمار ۰/۱ درصد ژلان-۰/۱ درصد کازئینات، با توجه به جدول ۱، مشخص است که بیش از ۵۰ درصد ذرات، قطری زیر ۳۷۲ نانومتر دارند و ۹۰ درصد اندازه ذرات زیر ۱۱۷۰ نانومتر است.

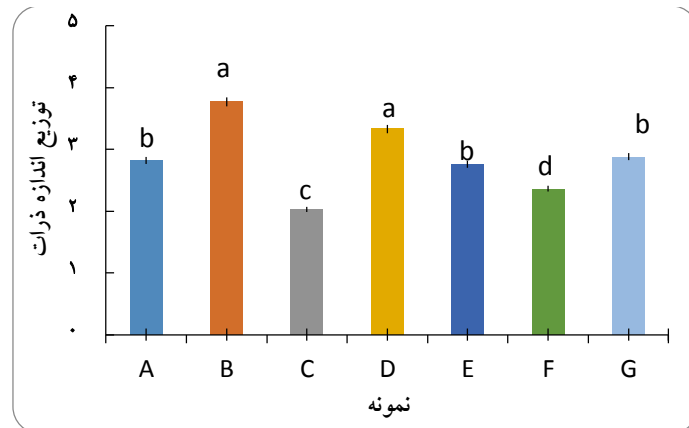
جدول ۱- پارامترهای مربوط به اندازه ذرات و توزیع اندازه ذرات در غلظت‌های مختلف بیوپلیمر کازئینات- ژلان در pH= ۴/۹.

تیمار	کازئینات (درصد)	ژلان (درصد)	d(4,3)	d(0.1)	d(0.9)	میانه	مد	اسپن
A	۱	۰	۱۳۳۶±۰/۳۲۹	۴۰۶۶	۵۱۵	۱۲۵۹	۶۱۵	۲/۸۲
B	۰/۱	۰/۰۵	۷۶۲±۰/۳۷۱	۲۶۳۶	۳۰۳	۶۱۸	۴۹۹	۳/۷۷
C	۰/۵	۰/۰۵	۱۱۴۴±۰/۲۸۳	۲۷۳۳	۵۰۴	۱۰۹۳	۷۵۷	۲/۰۳
D	۱	۰/۰۵	۱۲۵۵±۰/۳۵۸	۴۱۴۸	۴۸۹	۱۰۹۶	۶۱۵	۳/۳۳
E	۰/۱	۰/۱	۳۸۵±۰/۳۳۴	۱۱۷۰	۱۴۱	۳۷۲	۴۰۵	۲/۷۶
F	۰/۵	۰/۱	۶۹۲±۰/۲۶۸	۱۷۹۰	۳۳۶	۶۱۵	۴۹۹	۲/۳۶
G	۱	۰/۱	۷۲۹±۰/۳۱۴	۲۱۴۹	۳۱۱	۶۳۶	۴۹۹	۲/۸۸



شکل ۱- اندازه ذرات کمپلکس کازئینات- ژلان در غلظت‌های مختلف دو بیوپلیمر در pH= ۴/۹: نمونه شاهد (A) درصد کازئینات (A)، نمونه ۰/۱ درصد کازئینات-۰/۰۵ درصد ژلان (B)، نمونه ۰/۵ درصد کازئینات-۰/۰۵ درصد

ژلان (C)، نمونه ۱ درصد کازئینات-۰/۰۵ درصد ژلان (D)، نمونه ۰/۱ درصد کازئینات-۰/۱ درصد ژلان (E)، نمونه ۰/۵ درصد کازئینات-۰/۱ درصد ژلان (F)، نمونه ۱ درصد کازئینات-۰/۱ درصد ژلان (G). حروف متفاوت بالای ستون‌ها نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در آزمون دانکن در سطح ۵ درصد هستند.



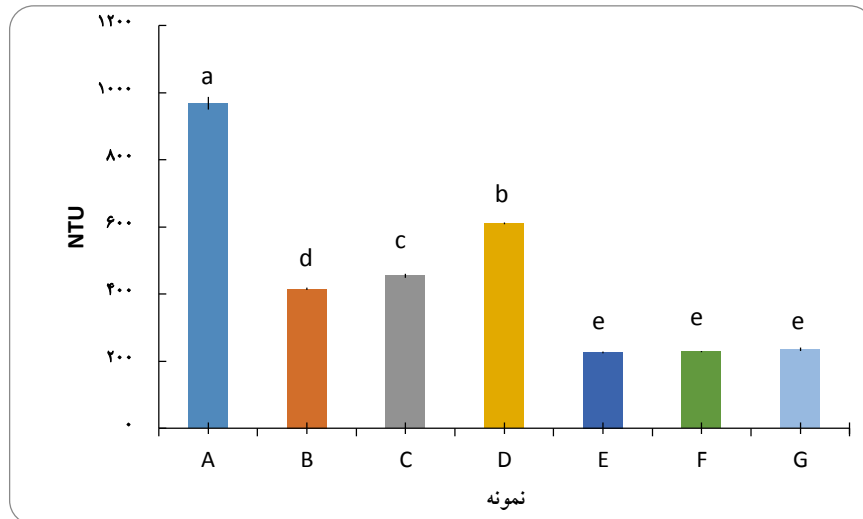
شکل ۲- توزیع اندازه ذرات (اسپن) ذرات کمپلکس کازئینات-ژلان در غلظت‌های مختلف دو بیوپلیمر در $pH=4/9$: نمونه شاهد (۱درصد کازئینات- صفر درصد ژلان) (A)، نمونه ۰/۱ درصد کازئینات-۰/۰۵ درصد ژلان (B)، نمونه ۰/۵ درصد کازئینات-۰/۰۵ درصد ژلان (C)، نمونه ۱ درصد کازئینات-۰/۰۵ درصد ژلان (D)، نمونه ۰/۱ درصد کازئینات-۰/۱ درصد ژلان (E)، نمونه ۰/۵ درصد کازئینات-۰/۱ درصد ژلان (F)، نمونه ۱ درصد کازئینات-۰/۱ درصد ژلان (G). حروف متفاوت بالای ستون‌ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در آزمون دانکن در سطح ۵ درصد هستند.

در تحقیقات سایر دانشمندان نیز که به بررسی این مسئله پرداخته اند نیز نتایج مشابهی دیده شده است. ران^۱ و همکاران در سال ۲۰۱۰ در تحقیقی بر روی نانو کمپلکس بتالاکتوگلوبولین - ژلان به‌عنوان حامل، اندازه ذرات در محلول خالص بتالاکتوگلوبولین را ۱۲ نانومتر و در حضور حامل ۵۶ نانومتر گزارش کردند و این افزایش اندازه ذرات را به تجمع پروتئین بعد از افزودن حامل نسبت دادند. در تحقیقی دیگر از رلکین^۲ و شوکت^۳ در سال ۲۰۱۲ بتالاکتوگلوبولین به‌عنوان حامل آلفا توکوفرول استفاده شد و در این پژوهش، اندازه ذرات بتالاکتوگلوبولین ۱۸۳ نانومتر گزارش شد و با افزودن آلفاتوکوفرول به ۳۱۴ نانومتر رسید.

1- Ron
2- Relkin
3- Shukat

این پژوهش با نتایج لو^۱ و همکاران در سال ۲۰۱۱ مطابقت دارد که با افزایش غلظت پروتئین زئین به ۲۰ میلی گرم در هر میلی لیتر، اندازه ذرات بزرگتر گردید بطوری که در غلظت ۵ تا ۱۵ میلی گرم در هر میلی لیتر زئین، اندازه ذرات در حدود ۳۵۰ نانومتر بود ولی با افزایش غلظت زئین به ۲۰ میلی گرم، اندازه ذرات به ۵۴۷ نانومتر افزایش یافت. این محققان بیان کردند که با افزایش غلظت زئین، احتمال تجمع و توده شدن پروتئین‌ها افزایش می‌یابد.

اندازه‌گیری کدورت: شکل ۳، میزان کدورت نمونه شاهد (کازئینات ۱ درصد) و نمونه‌های کمپلکس را در $pH=4/9$ نشان می‌دهد. با افزودن صمغ ژلان مقادیر کدورت به شدت کاهش یافت که به کاهش اندازه ذرات می‌تواند مربوط باشد. همچنین با افزایش غلظت ژلان از ۰/۰۵ به ۰/۱ درصد، کاهش معنی داری در میزان کدورت سیستم مشاهده شد افزایش در میزان کدورت سیستم‌های کلونیدی حاوی کمپلکس پروتئین- پلی ساکارید، به دو عامل افزایش در اندازه ذرات و افزایش در تعداد کمپلکس‌های تشکیل شده مربوط می‌شود. با توجه به نتایج اندازه ذرات، می‌توان گفت که کاهش کدورت به کاهش اندازه ذرات کمپلکس می‌تواند مربوط باشد. با افزایش مقدار ژلان، دافعه استری و الکترواستاتیکی (افزایش بارهای منفی) افزایش یافته و از نزدیک شدن ذرات کمپلکس به یکدیگر جلوگیری می‌کند. در پژوهش‌های مشابه، ران و همکاران در سال ۲۰۱۰، اثر غلظت پکتین را بر کدورت کمپلکس پکتین- بتالاکتوگلوبولین بررسی کردند و اعلام کردند که هر چه غلظت پکتین بیشتر شود کدورت کمتر می‌شود. در همین ارتباط، زایمت و همکاران در سال ۲۰۰۹، بیان کردند که در مقادیر بسیار کم پکتین، کدورت سیستم به شدت افزایش می‌یابد.

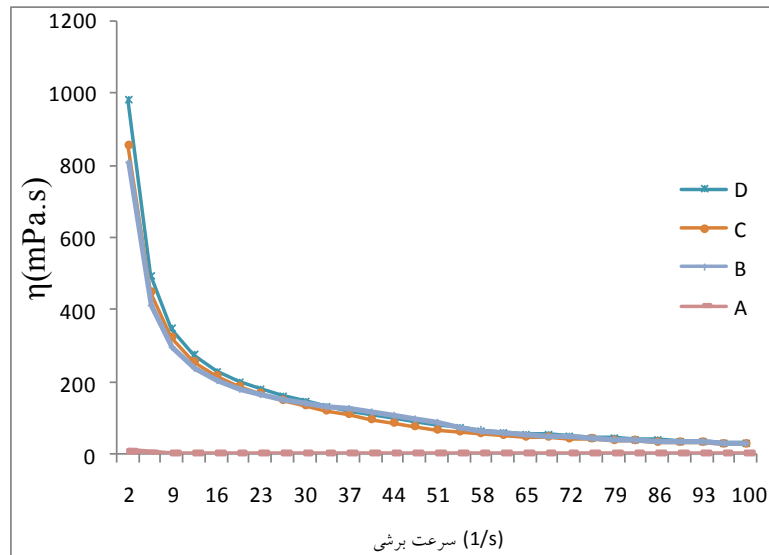


شکل ۳- تاثیر غلظت بیوپلیمرها بر کدورت سیستم حاوی کمپلکس ژلان-کازئینات در $\text{pH} = 4/9$. نمونه شاهد (A) درصد کازئینات- صفر درصد ژلان (A)، نمونه 0/1 درصد کازئینات-0/05 درصد ژلان (B)، نمونه 0/5 درصد کازئینات-0/05 درصد ژلان (C)، نمونه 1 درصد کازئینات-0/05 درصد ژلان (D)، نمونه 0/1 درصد کازئینات-0/1 درصد ژلان (E)، نمونه 0/5 درصد کازئینات-0/1 درصد ژلان (F)، نمونه 1 درصد کازئینات-0/1 درصد ژلان (G). حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار در آزمون دانکن در سطح 5 درصد هستند.

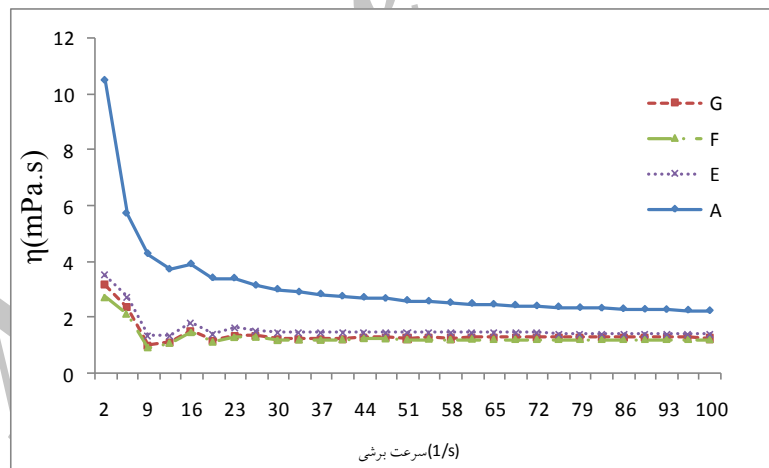
مطابق نتایج جانز و همکاران در سال 2010، افزایش کدورت محلول‌های بتالاکتوگلوبولین-پکتین با کاهش pH از 5 تا 3/5، بیشتر از محلول‌های بتالاکتوگلوبولین-کاراگینان بود و از آنجا که اندازه ذرات محلول بتالاکتوگلوبولین-پکتین کمتر بود، افزایش کدورت به تشکیل تعداد کمپلکس بیشتر در محلول‌های بتالاکتوگلوبولین-پکتین نسبت داده شد.

بررسی ویژگی‌های رئولوژیکی: هدف اصلی از ارزیابی خواص رئولوژیکی محلول‌های کمپلکس، دسترسی به اطلاعاتی راجع به ساختار کمپلکس‌های ژلان-کازئینات و همچنین خواص حسی سیستم مدل می‌باشد. همچنین، با توجه به هدف این پژوهش که استفاده از این نانوکپسول‌های حاوی ترکیبات مغذی در نوشیدنی‌های اسیدی است، باید از عدم تشکیل ژل و نامطلوب شدن خواص ارگانولپتیکی

محصول اطمینان حاصل کرد (بنیونز و همکاران، ۲۰۱۲). برای این منظور ابتدا خواص رئولوژیکی پایا و سپس خواص رئولوژیکی نوسانی سیستم‌های مدل حاوی نانوکپسول‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند. بررسی خواص رئولوژیک پایا: در آزمون رئولوژیکی پایا، رفتار جریانی محلول شاهد (نمونه کازئینات ۱ درصد) و نمونه‌های کمپلکس ژلان-کازئینات مورد بررسی قرار گرفت. در شکل‌های ۴ و ۵، منحنی‌های ویسکوزیته برحسب سرعت برشی نشان می‌دهد که در سرعت‌های برشی تقریباً ۲۰-۲ بر ثانیه، تمامی محلول‌ها یک رفتار روان شونده با برش (سود و پلاستیک) نشان می‌دهند و بالاتر از این سرعت برشی رفتار نیوتنی ظاهر می‌گردد و به عبارت دیگر، در سرعت‌های برشی بالاتر از ۲۰ بر ثانیه ویسکوزیته بستگی به سرعت برشی ندارد. همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود نمونه‌های حاوی ۰/۰۵ درصد ژلان دارای ویسکوزیته ظاهری بالاتری نسبت به نمونه شاهد هستند در صورتی که نمونه‌های حاوی ۰/۱ درصد ژلان ویسکوزیته کمتری نسبت به نمونه‌های شاهد نشان می‌دهند. همچنین نمونه‌های حاوی ۰/۱ درصد ژلان ویسکوزیته کمتری نسبت به نمونه‌های حاوی ۰/۱ درصد ژلان دارا بودند. همان‌طور که ملاحظه می‌شود هم در غلظت‌های پائین و هم در غلظت‌های بالای ژلان، تاثیر غلظت کازئینات در محدوده (۰/۱ تا ۱ درصد بر ویسکوزیته ظاهری بالا نیست و تغییر غلظت ژلان مهم‌ترین عامل تاثیرگذار بر ویسکوزیته ظاهری است. مطابق نتایج، افزودن ژلان در غلظت‌های پایین (۰/۰۵ درصد) باعث افزایش شدیدی در ویسکوزیته محلول‌های حاوی کازئینات (۰/۱، ۰/۵ و ۱ درصد) شده است ولی به صورت غیر منتظره‌ای افزایش غلظت ژلان از ۰/۰۵ به ۰/۱ درصد نه تنها موجب افزایش ویسکوزیته محلول‌ها نگردیده بلکه موجب کاهش آنها نیز شده است.



شکل ۴- منحنی ویسکوزیته ظاهری بر حسب سرعت برشی برای محلول کازئینات ۱ درصد (A) و محلول‌های کمپلکس حاوی ۰/۰۵ درصد ژلان: نمونه ۰/۱ درصد کازئینات (B)، نمونه ۰/۵ درصد کازئینات (C)، نمونه ۱ درصد کازئینات (D).



شکل ۵- منحنی ویسکوزیته ظاهری بر حسب سرعت برشی برای محلول کازئینات ۱ درصد (A) و محلول‌های کمپلکس حاوی ۰/۱ درصد ژلان: نمونه ۰/۱ درصد کازئینات (E)، نمونه ۰/۵ درصد کازئینات (F)، نمونه ۱ درصد کازئینات (G).

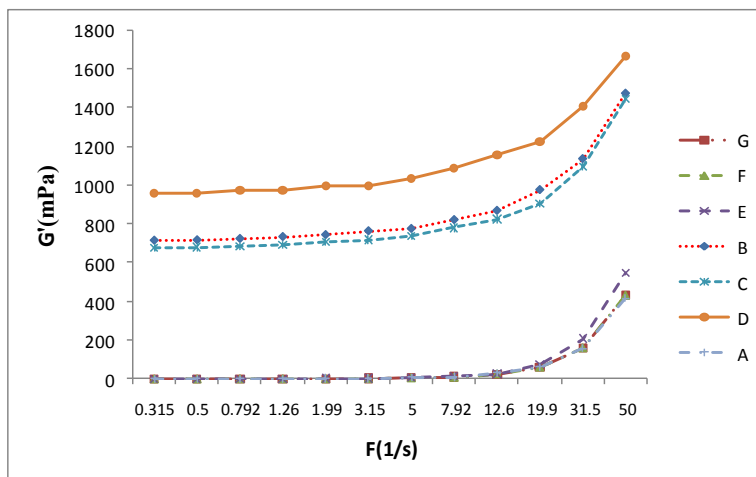
در یک کسر حجمی ثابت، ویسکوزیته محلول بستگی به اندازه ذرات، توزیع اندازه ذرات و میزان لخته شدن ذرات دارد و با افزایش این سه پارامتر، به ترتیب ویسکوزیته کاهش، کاهش و افزایش می‌یابد. بنا بر تحقیقات پژوهشگران مختلف، پلی‌ساکاریدهای آنیونی در غلظت‌های پایین می‌توانند باعث افزایش ویسکوزیته محلول‌های حاوی ذرات پروتئینی گردند. در غلظت پایین، مقادیر کافی پلی‌ساکارید برای پوشاندن ذرات کازئینی وجود نخواهد داشت و تنها بخشی از سطح کازئین توسط پلی‌ساکارید آنیونی پوشانده می‌شود و زنجیره‌های آزاد آنها می‌توانند با ذرات دیگر پل تشکیل دهند و نوعی انبوهش (فلاکولاسیون) که انبوهش ناشی از پل^۱ گفته می‌شود، رخ می‌دهد که به نوبه خود می‌تواند منجر به افزایش ویسکوزیته گردد. با افزایش غلظت پلی‌ساکارید آنیونی و رسیدن به غلظت‌های متوسط (۰/۱ درصد برای ژلان) مقادیر کافی ژلان برای پوشاندن ذرات کازئینی وجود خواهد داشت و در نتیجه سطح ذرات به‌خوبی پوشانده شده و نیروی دافعه کافی و پیوستگی زنجیری بالا در سطح ایجاد می‌گردد که نتیجه آن پایداری سیستم، کاهش انبوهش و در نتیجه کاهش ویسکوزیته سیستم خواهد بود. یکی از مدل‌هایی که به‌صورت گسترده برای تفسیر رفتار رئولوژیکی مورد استفاده قرار می‌گیرد مدل قانون توان می‌باشد. در جدول ۲ مقادیر شاخص جریان (n) و همچنین ضریب تبیین R² بدست آمده از مدل قانون توان برای تمام نمونه‌های آزمایشی با درصد‌های مختلف نشان داده شده است.

جدول ۲- پارامترهای محاسبه شده مربوط به قانون توان برای نمونه‌ها، شامل اندیس جریان، ضریب قوام و ضریب تبیین

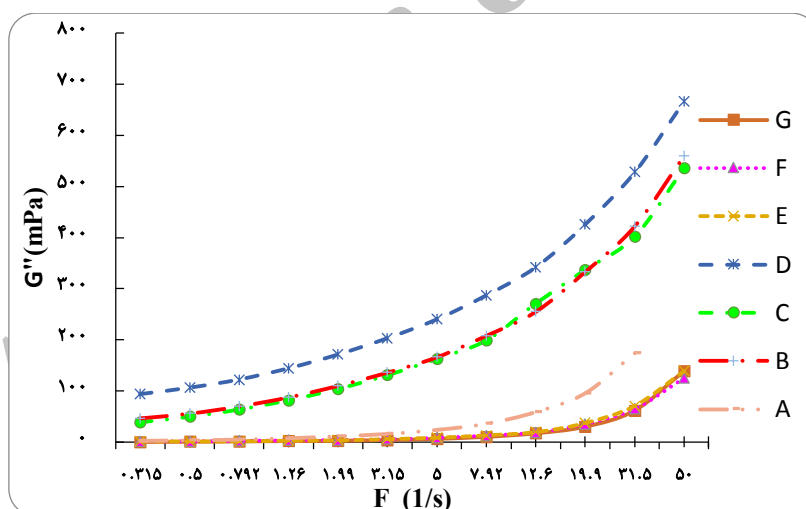
نوع تیمار	کازئینات سدیم (%)	ژلان (%)	شاخص جریان	ضریب قوام	ضریب تبیین
A	۱	۰	۰/۵۷	۱۲/۴	۰/۹۷
B	۰/۱	۰/۰۵	۰/۳۵	۱۲۱۹/۹۸	۰/۹۹
C	۰/۵	۰/۰۵	۰/۳۰	۱۴۵۵/۵۸	۰/۹۸
D	۱	۰/۰۵	۰/۲۹	۱۶۳۲/۶۴	۰/۹۹
E	۰/۱	۰/۱	۰/۷۰	۳/۷۴	۰/۹۲
F	۰/۵	۰/۱	۰/۷۴	۲/۷۰	۰/۸۹
G	۱	۰/۱	۰/۶۹	۳/۱۶	۰/۸۸

با توجه به جدول فوق، در محدوده سرعت برشی ۲-۳۷ بر ثانیه، داده‌های شاخص جریان همگی کمتر از عدد یک می‌باشند که نشان می‌دهد تمامی نمونه‌ها دارای رفتار روان شونده با برش (سودوپلاستیک) می‌باشند و در این میان نمونه‌های دارای ۰/۰۵ درصد ژلان دارای درجه روان شوندگی با برش بیشتری هستند. داده‌های ضریب قوام حاکی از بالا بودن غیر عادی مقادیر آن در نمونه‌های با ۰/۰۵ درصد می‌باشد که مکانیسم آن در توضیحات مربوط به ویسکوزیته منعکس شده و به نظر می‌رسد که به انبوهش ناشی از تشکیل پل در غلظت‌های پایین پلی‌ساکارید آنیونی مربوط باشد. هاشمی‌نیا و همکاران (۱۳۹۰)، در پژوهشی اثر ایجاد برهم‌کنش بین پروتئین‌های شیر با بار مثبت و ژلان را بر اندیس قوام و شاخص جریان بررسی کردند و بیان کردند که این برهم‌کنش سبب افزایش شاخص قوام و ویسکوزیته در تنش برشی ثابت و کاهش اندیس جریان می‌شود. دما، pH، ظرفیت اتصال به مولکول‌های آب و غلظت محلول از جمله عواملی هستند که می‌توانند بر ضریب قوام مؤثر باشند.

بررسی خواص رئولوژیکی نوسانی: آزمون روبش فرکانس نشان داد که مقادیر مدول ذخیره (G') و مدول افت (G'') در غلظت ۰/۰۵ درصد ژلان، با افزایش غلظت کازئینات از ۰/۵ به ۱ درصد افزایش چشمگیری یافت (شکل‌های ۶ و ۷) که به افزایش کسر حجمی فاز پراکنده و همچنین افزایش امکان توده شدن ذرات می‌تواند مربوط باشد ولی این افزایش در غلظت ۰/۱ درصد ژلان چندان چشمگیر نبود که به کافی بودن ژلان برای جلوگیری از انبوهش ذرات می‌توان نسبت داد. به‌طور کلی مدول‌های ویسکوالاستیک نمونه‌های حاوی ۰/۰۵ درصد ژلان، به مراتب از نمونه شاهد و نمونه‌های دارای ۰/۱ درصد ژلان بیشتر بود که این نشان می‌دهد که هم ویژگی‌های ویسکوز (ویژگی‌های جریان) و هم ویژگی‌های الاستیک (مربوط به ساختار شبکه) در این نمونه‌ها بالاتر است که می‌تواند به انبوهش جزئی ذرات و تشکیل شبکه ضعیف در آنها نسبت داده شود. همچنین نمونه شاهد (A) دارای مقادیر مدول افت بالاتری نسبت به نمونه‌های دارای ۰/۱ درصد ژلان بود که نشان می‌دهد بالا رفتن غلظت ژلان می‌تواند موجب کاهش مدول‌های ویسکوالاستیک گردد. ماتیا و همکاران در سال ۲۰۰۴، نیز در مطالعه بر روی تأثیر افزودن ژلان آمیده شده کم‌استر روی رئولوژی و ریزساختار ژل‌های آمیدی حاصل از کازئینات سدیم، نشان دادند که مدول ذخیره (G') سیستم، با افزایش میزان ژلان از ۱ درصد به ۴ درصد (w/v)، شروع به کاهش می‌کند، بنابراین می‌توان گفت که میزان ژلان مازاد بر روی تجمع مولکول‌ها و تشکیل شبکه تأثیرگذار بوده و در نهایت موجب کاهش مدول الاستیک و سرعت کمتر تشکیل ژل می‌گردد.

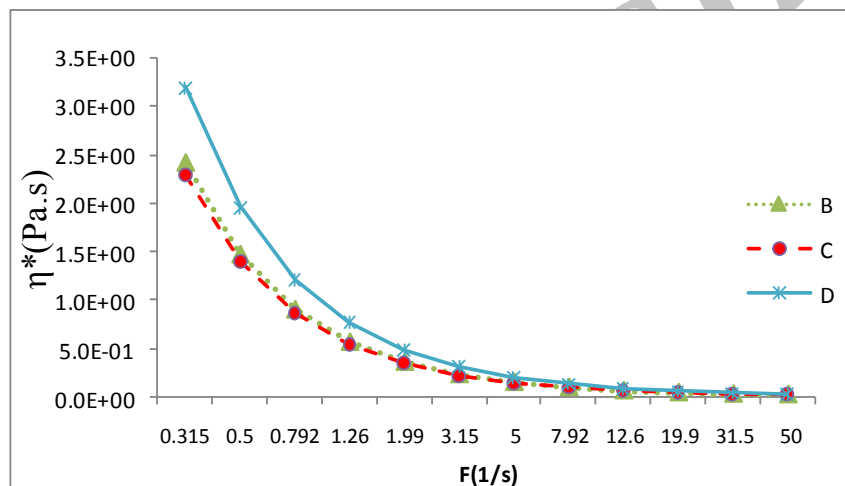


شکل ۶- منحنی مدول ذخیره بر حسب فرکانس در مقادیر کرنش ۰/۰۱ درصد: نمونه شاهد (۱ درصد کازئینات- صفر درصد ژلان) (A)، نمونه ۰/۱ درصد کازئینات-۰/۰۵ درصد ژلان (B)، نمونه ۰/۵ درصد کازئینات-۰/۰۵ درصد ژلان (C)، نمونه ۱ درصد کازئینات-۰/۰۵ درصد ژلان (D)، نمونه ۰/۱ درصد کازئینات-۰/۱ درصد ژلان (E)، نمونه ۰/۵ درصد کازئینات-۰/۱ درصد ژلان (F)، نمونه ۱ درصد کازئینات-۰/۱ درصد ژلان (G).

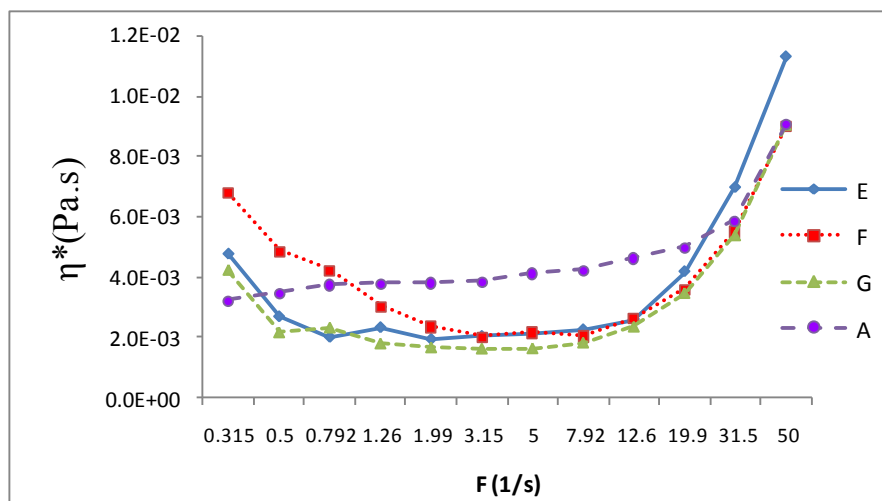


شکل ۷: منحنی مدول افت بر حسب فرکانس در مقادیر کرنش ۰/۰۱ درصد: نمونه شاهد (۱ درصد کازئینات- صفر درصد ژلان) (A)، نمونه ۰/۱ درصد کازئینات-۰/۰۵ درصد ژلان (B)، نمونه ۰/۵ درصد کازئینات-۰/۰۵ درصد ژلان (C)، نمونه ۱ درصد کازئینات-۰/۰۵ درصد ژلان (D)، نمونه ۰/۱ درصد کازئینات-۰/۱ درصد ژلان (E)، نمونه ۰/۵ درصد کازئینات-۰/۱ درصد ژلان (F)، نمونه ۱ درصد کازئینات-۰/۱ درصد ژلان (G).

شکل های ۸ و ۹ تغییرات ویسکوزیته کمپلکس (η^*) را برحسب فرکانس نشان می دهد. نمونه های حاوی ۰/۰۵ درصد ژلان، رفتار روان شونده با فرکانس را نشان می دهند. داده های ویسکوزیته کمپلکس نشان می دهد که سفتی کلی نمونه های حاوی ۰/۰۵ درصد ژلان بیشتر از نمونه های حاوی ۰/۱ درصد ژلان است و همچنین با افزایش مقادیر کازئینات سدیم در نمونه های حاوی ۰/۰۵ درصد ژلان مقدار سفتی کلی افزایش می یابد. در نمونه های حاوی ۰/۱ درصد ژلان ابتدا کاهش و سپس افزایش در ویسکوزیته کمپلکس مشاهده می شود. در فرکانس های پایین تا ۵ بر ثانیه، روند کاهش ویسکوزیته کمپلکس با افزایش فرکانس مشاهده می گردد ولی سپس این روند افزایش می یابد.

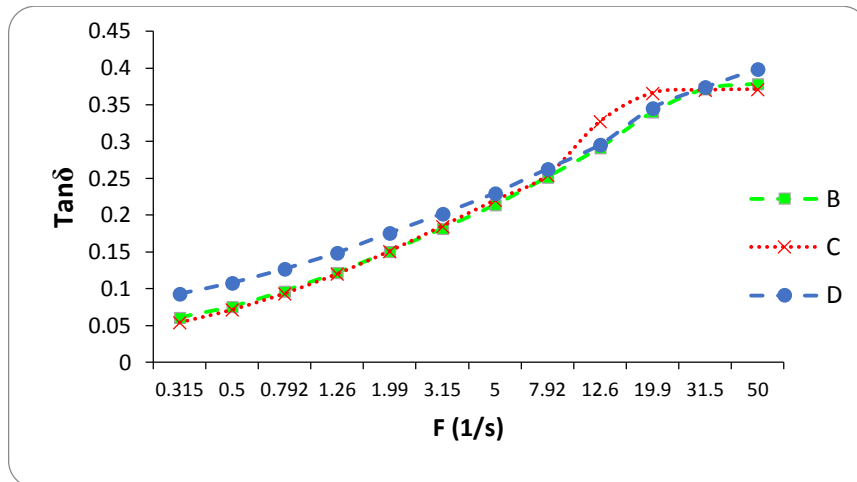


شکل ۸- منحنی ویسکوزیته کمپلکس بر حسب فرکانس در مقادیر کرنش ۰/۰۱ درصد برای محلول های حاوی ۰/۰۵ درصد ژلان: نمونه ۰/۱ درصد کازئینات (B)، نمونه ۰/۵ درصد کازئینات (C)، نمونه ۱ درصد کازئینات (D).

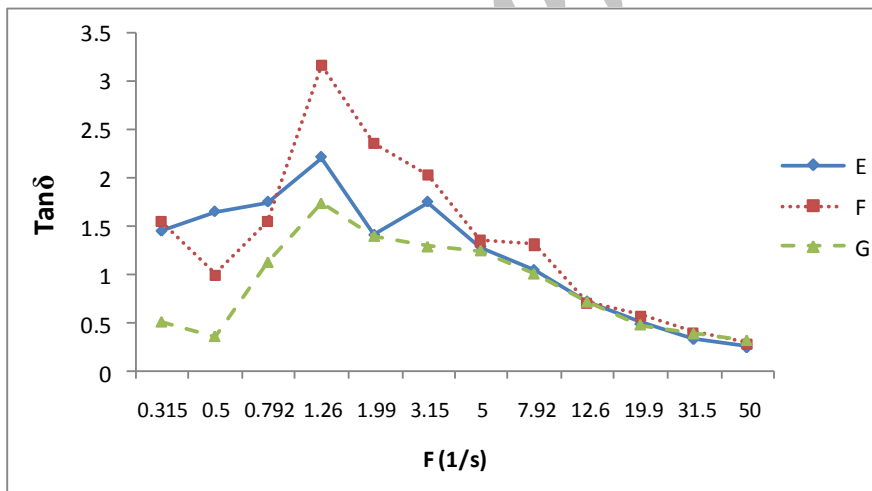


شکل ۹- منحنی ویسکوزیته کمپلکس بر حسب فرکانس در مقادیر کرنش ۰/۰۱ درصد برای محلول‌های حاوی ۰/۰۵ درصد ژلان: نمونه شاهد (۱ درصد کازئینات- صفر درصد ژلان) (A)، نمونه ۱ درصد کازئینات (D)، نمونه ۰/۱ درصد کازئینات (E)، نمونه ۰/۵ درصد کازئینات (F)، نمونه ۱ درصد کازئینات (G).

فاکتور افت یا ($Tan\delta$) پارامتری است که از نسبت مدول افت به ذخیره بدست می‌آید و آن نشان می‌دهد که ماده دارای ویژگی جامد بیشتری است یا ویژگی جریانی غالب است. در سیالات ویسکوالاستیکی که رفتار جامدگون غالب است، یعنی شبکه ژلی تشکیل می‌شود، مقادیر $Tan\delta$ از یک کمتر خواهد بود. نمودارها نشان می‌دهند که در تمامی نمونه‌ها و تمامی فرکانس‌های مورد استفاده، مقادیر $Tan\delta$ کمتر از یک می‌باشد و به عبارت دیگر در غلظت‌های ژلان مورد استفاده، شبکه ژلی قوی تشکیل نمی‌شود. در نمونه شاهد مقادیر $Tan\delta$ در فرکانس‌های بالا (بالتر از ۲۰ بر ثانیه) از یک بیشتر بود. با توجه به نمودار در فرکانس‌های متوسط، مقادیر $Tan\delta$ بیشتر از یک است که نشان‌دهنده برتری ویژگی‌های جریانی به ویژگی‌های الاستیک است. در این محلول‌ها به علت عدم برهم‌کنش‌های جذبی کافی و عدم تشکیل لخته و در نتیجه عدم توسعه شبکه ژلی سیستم مایع گون و بدون ایجاد ساختار، باقی‌مانده است. ولی در فرکانس‌های بالاتر، $Tan\delta$ به مقادیر کمتر از یک سوق پیدا می‌کند که ظهور ویژگی‌های جامدگون را در سیستم نشان می‌دهد.



شکل ۱۰- منحنی تانژانت افت بر حسب فرکانس در مقادیر کرنش ۰/۰۱ درصد برای محلول‌های حاوی ۰/۰۵ درصد ژلان: نمونه (B) درصد کازئینات (B)، نمونه ۰/۵ درصد کازئینات (C)، نمونه ۱ درصد کازئینات (D).



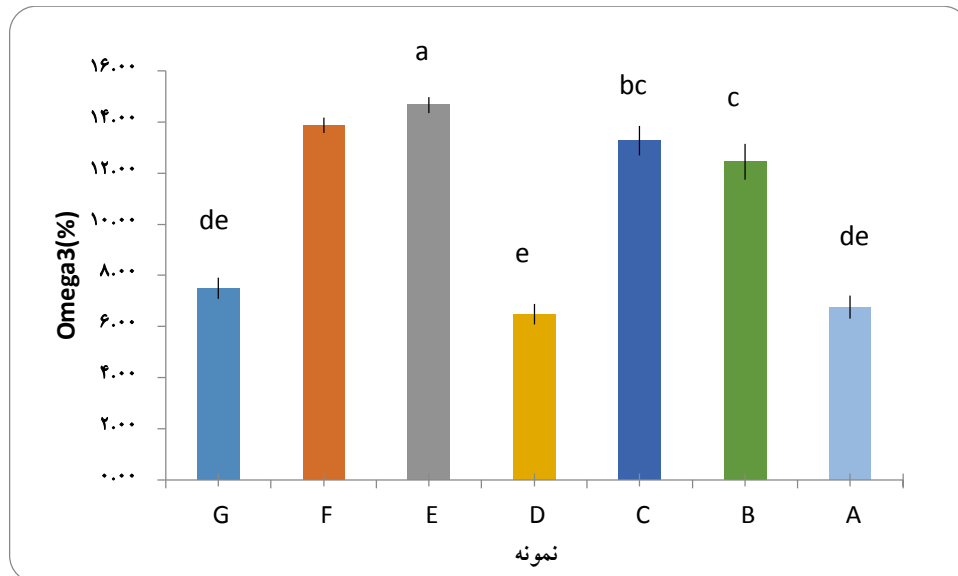
شکل ۱۱- منحنی تانژانت افت بر حسب فرکانس در مقادیر کرنش ۰/۰۱ درصد برای محلول‌های حاوی ۰/۰۵ درصد ژلان: نمونه (D) درصد کازئینات (D)، نمونه ۰/۱ درصد کازئینات (E)، نمونه ۰/۵ درصد کازئینات (F)، نمونه ۱ درصد کازئینات (G).

تعیین مقدار DHA توسط کروماتوگرافی گازی (GC): کروماتوگرافی گازی به منظور شناسایی ترکیبات سازنده اصلی مخلوط امگا سه و سپس به منظور بررسی کپسولاسیون آن توسط بیوپلیمرها مورد استفاده قرار گرفت.

کروماتوگرافی گازی، حضور ترکیبات مختلفی از جمله اسیدپالمیتیک، اسیداولئیک، اسیداستئاریک، ایکوزاهگزانوئیک اسید و دوکوزاهگزانوئیک اسید را در ساختار مخلوط امگاسه مصرفی نشان داد (امگا سه به صورت خالص عرضه نمی‌شود بلکه به صورت مخلوط به بازار عرضه می‌گردد). انواع مختلف اسیدهای چرب موجود در امگا سه کپسوله شده در جدول ۳ نشان داده شده است. با توجه به نتایج، افزودن ژلان موجب افزایش درون‌پوشانی اسیدهای چرب توسط کازئینات گردید. از طرفی در غلظت ثابت ژلان، با افزایش غلظت کازئینات، میزان درون‌پوشانی کاهش یافت. همچنین، با افزایش غلظت ژلان از ۰/۰۵ به ۰/۱ درصد، به مقدار کمی درون‌پوشانی افزایش پیدا کرد و میزان اسید چرب کل از ۷/۰۸ درصد در نمونه‌های بدون ژلان به ۱۴/۸۹ درصد در نمونه‌های حاوی ۰/۱ درصد ژلان-۰/۱ درصد کازئینات (نمونه E) افزایش یافت و بالاترین درصد درون‌پوشانی اسیدهای چرب امگا سه و اسیدهای چرب کل در نمونه E مشاهده گردید. در تحقیقی مشابه، لئو و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند که با افزایش غلظت زئین، در کمپلکس زئین-کیتوزان، درصد کپسولاسیون آلفا توکوفرول افزایش یافت. آنها همچنین نشان دادند که بین کارایی کپسولاسیون نانو ذرات زئین-آلفاتوکوفرول و کمپلکس زئین-کیتوزان-توکوفرول اختلاف معنی‌داری وجود ندارد زیرا آلفا توکوفرول قبل از افزودن کیتوزان به‌عنوان پوشش دهنده در ساختار زئین قرار می‌گیرد.

جدول ۳- ترکیبات شناخته شده در ساختار مخلوط امگا سه.

نمونه	اسید پالمیتیک (%)	اسید اولئیک (%)	اسید استئاریک (%)	EPA (%)	DHA (%)	کل (%)
نمونه A	۰/۵۷	۰/۷۳	۰/۳۹	۳	۱/۶۸	۶/۳۷
نمونه B	۰/۷۶	۱/۲۶	۰/۶۴	۵/۸	۳/۵۷	۱۲/۰۳
نمونه C	۰/۸۷	۱/۴۴	۰/۷۲	۶/۶۴	۴/۲۵	۱۳/۹۲
نمونه D	۰/۵۶	۰/۷۲	۰/۳۹	۲/۹۸	۱/۸	۶/۴۵
نمونه E	۰/۹۲	۱/۵	۰/۷۷	۷	۴/۷	۱۴/۸۹
نمونه F	۰/۹۵	۱/۴	۰/۷۳	۶/۴۷	۴/۲۵	۱۳/۸
نمونه G	۰/۶۸	۰/۷۶	۰/۴	۳/۱۴	۲/۱	۷/۰۸



شکل ۱۲: مقادیر امگا ۳ در تیمارهای مختلف. نمونه شاهد (۱ درصد کازئینات- صفر درصد ژلان) (A)، نمونه ۰/۱ درصد کازئینات-۰/۰۵ درصد ژلان (B)، نمونه ۰/۵ درصد کازئینات-۰/۰۵ درصد ژلان (C)، نمونه ۱ درصد کازئینات-۰/۰۵ درصد ژلان (D)، نمونه ۰/۱ درصد کازئینات-۰/۱ درصد ژلان (E)، نمونه ۰/۵ درصد کازئینات-۰/۱ درصد ژلان (F)، نمونه ۱ درصد کازئینات-۰/۱ درصد ژلان (G). حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در آزمون دانکن در سطح ۵ درصد هستند به طوری که حرف a دارای بیشترین اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از این پژوهش، نشان داد که کازئین با داشتن بخش‌های آب‌گریز در ساختار خود، برای به دام انداختن و انتقال امگا سه، ترکیبی مناسب است. همچنین ژلان، بیوپلیمری سازگار با کازئین است که با ایجاد برهم‌کنش‌های الکتروستاتیک، سبب پایداری این سیستم و همچنین ایجاد حفاظت بیشتر برای امگا سه می‌شود. بین کازئینات سدیم و ژلان در $pH=4/9$ کمپلکس تشکیل می‌شود و کوچک‌ترین اندازه ذره در کازئینات ۰/۱ و ژلان ۰/۱ درصد به دست آمد. اندازه ذرات با افزایش غلظت ژلان و کاهش غلظت کازئینات کاهش یافت و با افزایش غلظت ژلان از ۰/۰۵ به ۰/۱ درصد، کدورت کاهش یافت. بالاترین میزان سطح درون پوشانی در نمونه با کازئینات ۰/۱ و ژلان ۰/۱ درصد مشاهده شد و با افزایش کازئینات و ژلان، درصد درون پوشانی به ترتیب کاهش و افزایش یافت؛ کمترین ویسکوزیته در نمونه‌های

با ژلان ۰/۱ درصد مشاهده شد. بیشترین ضریب قوام، رفتار روان‌شونده با برش و مدول‌های ویسکوالاستیک در نمونه‌های با ژلان ۰/۰۵ درصد گزارش شد.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از واحد تحقیق و توسعه شرکت کشت و صنعت تکدانه و همچنین جناب آقای دکتر اسدی و همکاران در آزمایشگاه کنترل کیفی این شرکت، که در انجام این پروژه همکاری شایانی نمودند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

- Benyounes KH., and Abdelbaki, B. 2012. Rheological and electro kinetic properties of carboxymethylcellulose-water dispersions in the presence of salts. *International Journal of Physical Sciences*, 7(11): 1790–1798.
- Chaudhry, Q., Watkins, R. and Castle, L. 2010. Nanotechnologies in the food area: New Opportunities, New Questions, New Concerns. RSC Publishing, 1-16.
- Chen, L., Remondetto, G.E. and Subirade, M. 2006. Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. *Trend Food Science Technology*, 17: 272-283.
- Fang, Z. and Bhesh, B. 2010. Encapsulation of polyphenols. *Trend in Food Science Technology*, 21: 510-523.
- Harris, R., Lecumberri, E., Mateos-Aparicio, I., Mengibar, M. and Heras, A. 2011. Chitosan nanoparticles and microspheres for the encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. *Carbohydrate Polymers*, 84: 803–806.
- Hasheminya, S.M., Ebrahimzadeh-Mousavi, S.M.A., Ehsani, M.R. and 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.
- Jones, W., Decker, E.A. and 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.
- Livney, Y.D. 2010. Milk proteins as vehicles for bioactives. *Colloid Interface Science*, 15: 73–83.
- Luo, Y., Zhang, B., Whent, M., Yu, L., and Wang, Q. 2011. Preparation and characterization of zein/chitosan complex for encapsulation of alpha-tocopherol, and its in vitro controlled release study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 85: 145–152.

- Matalanis, A., Jones, O. and McClements, D.J. 2011. Structure biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds. *Food Hydrocolloid*, 3: 1-16.
- Nedovica, V., Kalusevica, A., Manojlovicb, V., Levica, S. and Bugarskib, B. 2011. An overview of encapsulation technologies for food. *Procardia Food Science*, 1, 1806–1815.
- Relkin, P. and Shukat, R. 2012. Food protein aggregates as vitamin-matrix carriers: impact of processing conditions. *Food Chemistry*, 134(4): 2141–2148.
- Ron, N., Zimet P., Bargarum, J. and 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.
- Santinho, J.P.A., Pereira, L.N., Freitas, O., and Collett, H.J. 1999. Influence of formulation on the physicochemical properties of casein micro particles, *International Journal of Pharmaceutics*, 186:191–198.
- Semo, E., Kesselman, E., Danino, D. and Livney, Y.D. 2007. Casein micelle as a natural nanocapsular vehicle for nutraceuticals. *Food Hydrocolloid*, 21: 936–942.
- Turgeon, S.L. and Laneuville, S.I. 2006. *Modern Biopolymer Science*, Elsevier Inc, USA, 339-342.
- Ye, A. 2008. Complexation between milk proteins and polysaccharides via electrostatic interaction: principles and applications. *International Journal Food Science Technology*, 43: 406-415.
- Zimet, P., Rosenberg, D. and Livney, Y.D. 2011. Re-assembled casein micelles and casein nanoparticles as nano-vehicle for omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Food Hydrocolloid*, 25: 1270-1276.
- Zimet, P. and Livney, Y.D. 2009. Beta-lactoglobulin and its nanocomplexes with pectin as vehicles for ω -3 polyunsaturated fatty acids. *Food Hydrocolloid*, 23: 1120–1126.
- Zuidam, J.N. and Shimoni, E. 2010. Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to make them. *Food Hydrocolloid*, 1-10.

Gellan -Caseinate Nanocomplexes as a Carrier of Omega-3 Fatty Acids: study of Particle size, Rheological Properties and Encapsulation Efficiency

**Ch. Azizanbari¹, B. Ghanbarzadeh^{2*}, H. Hamishehkar³
and M. Hosseini⁴**

¹ M.Sc., Dept. of Food Science and Technology, University of Tabriz, Tabriz, Iran,

² Associate Prof., Dept. of Food Science and Technology, University of Tabriz, Tabriz, Iran, ³Assistant Prof., of Pharmaceutical Technology Laboratory, Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, ⁴Takdaneh Corporation R&D Center, Marand, iran

Abstract

Biopolymer based nano-complex is a category of nano-carriers which are produced by interaction between protein and polysaccharide. They can carry hydrophobic nutraceuticals in aqueous solutions and also cause to increase of protection and bioavailability of encapsulated active materials. In this research, gellan-caseinate complexes containing omega3 were produced by adding gellan solutions to caseinate solutions containing omega3 and adjusting pH to below of caseinate isoelectric point (pI=4.9). The results of particle size studies by laser diffractions showed that particle sizes were continues increased with increasing caseinate concentration from 0.1 to 0.5 and 1% and adding gellan gum to caseinate solutions in two level of 0.05 and 0.1 % caused to decrease in size. The smallest particle (385 nanometer) were produced at the level of 0.1 % of gellan and caseinate and at this concentration, more than 50% and 90% of particles had diameter below 372 nm and 1170 nm, respectively. The turbidity increased with increasing gellan concentration from 0.5 to 0.1 which attributed to decreasing of particle size. The rheometry results showed that the lowest viscosity and highest consistency, shear thinning behavior and viscoelastic behavior could be observed at samples containing 0.1% and 0.05 % gellan, respectively. Gas chromatography results showed which increasing caseinate and gellan caused to decrease and increase in encapsulation percent, respectively and the highest level of encapsulation were observed at complex containing 0.1% gellan and 0.1%caseinate.

Keywords: Gellan-caseinate complexes, Encapsulation, Food – Medication, Particle size, Rheology

*Corresponding author; ghanbarzadeh@tabrizu.ac.ir