

نانوانکپسولاسیون اسیدهای چرب امگا ۳ توسط حامل‌های پکتین- کازئینات: بررسی تشکیل کمپلکس، اندازه ذرات و کارایی انکپسولاسیون

ساجده بحرانی^۱، بابک قنبرزاده^۲، حامد همیشه کار^۳، محمود صوتی خیابانی^۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، ایران

۲- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، ایران

۳- نویسنده مسئول: استادیار مرکز تحقیقات دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، ایران پست الکترونیکی: hamishehkar.hamed@gmail.com

۴- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، ایران

تاریخ دریافت: ۹۲/۱/۲۸

تاریخ پذیرش: ۹۲/۴/۲۵

چکیده

سابقه و هدف: کمپلکس‌های پروتئین- پلی‌ساکارید می‌توانند برای تولید نانوانکپسول‌های حاوی ترکیبات مغذی و فعال به کار روند. هدف از این پژوهش، تعیین شرایط بهینه برای تولید نانوکمپلکس‌های کازئینات-پکتین حاوی اسیدهای چرب امگا ۳ با کوچکترین اندازه و توزیع اندازه ذرات و بررسی پایداری و کارایی انکپسولاسیون آن می‌باشد.

مواد و روش‌ها: نانوکپسول‌ها با افزودن نمک‌های الکترولیت به محلول‌های کازئیناتی (۰/۵، ۱ و ۱/۵ w/v) حاوی محلول امگا ۳ و افزودن محلول پکتینی (۰/۲، ۰/۴۵ و ۰/۷ w/v) به سیستم و سپس تنظیم pH به زیر نقطه ایزوالکتریک کازئینات (۴/۶) تولید شدند. تعیین اندازه و توزیع ذرات، با روش پراکنش نور لیزری و تشخیص تشکیل کمپلکس و نوع برهمکنش‌های ایجاد شده بین بیوپلیمرها و اسید چرب امگا ۳ با آزمون‌های طیف‌سنجی فروسرخ (FTIR) و گرماسنجی افتراقی (DSC) بررسی شدند. از کروماتوگرافی گازی (GC) برای تعیین مقدار امگا ۳ کپسوله شده استفاده شد. در این تحقیق از آنالیز آماری فاکتوریل سطح پاسخ Box-bhenken و نرم افزار minitab 15 برای آنالیز اندازه ذرات استفاده شد.

یافته‌ها: کمپلکس حاوی کازئینات سدیم ۱/۰٪، پکتین ۰/۴۵٪ در pH=۴/۱، دارای کوچکترین اندازه ذره (۸۶ نانومتر) و کمترین کدورت بود و با کپسولاسیون امگا ۳، اندازه ذرات تا ۱۱۸ نانومتر افزایش یافت. نتایج FTIR، تشکیل کمپلکس و ایجاد برهمکنش (الکتروستاتیک و آبگریز) بین بیوپلیمرها و امگا ۳ و نتایج DSC، تشکیل ساختارهای جدید را نشان دادند. کروماتوگرافی گازی، کارایی کپسولاسیون را برای فرمولاسیون‌های مختلف بین ۱۲-۷۶٪ نشان داد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که pH و غلظت بیوپلیمرهای پکتین و کازئینات نقش مهمی در اندازه ذرات کمپلکس و نهایتاً پایداری و کارایی انکپسولاسیون دارند و این سیستم می‌تواند بطور مؤثری برای درون پوشانی (انکپسولاسیون) امگا ۳ در نوشیدنی‌های با pH نسبتاً اسیدی به کار رود.

واژگان کلیدی: نانوکمپلکس کازئینات-پکتین، امگا ۳، DSC، FTIR و کارایی انکپسولاسیون

• مقدمه

قلبی - عروقی نقش به سزایی دارند. اسید لینولنیک، اسید ایکوزا پنتونئیک (EPA) و اسید دوکوزا هگزانوئیک (DHA) مهم‌ترین اسیدهای چرب امگا هستند که منابع اصلی آن‌ها غذاهای دریایی و برخی از فرآورده‌های گیاهی مانند گردو، کلزا و بذر کتان می‌باشند (۴-۲). اسیدهای چرب امگا ۳ می‌توانند برای غنی‌سازی مواد غذایی کم‌چرب و یا تولید مواد غذایی فراسودمند مورد استفاده قرار گیرند، اما از آن جا که این ترکیبات آبگریز بوده و عملاً در آب نامحلولند، غنی-

آگاهی از خطرات احتمالی استفاده از غذاهای پرچرب، سبب شده است تا تقاضا برای غذاهای کم‌کالری و کم‌چرب و ترجیحاً غنی از فیبرهای رژیمی افزایش یابد که به نوبه خود موجب کمبود مواد مغذی محلول در چربی از جمله ویتامین‌های A، D، E و K، آنتی‌اکسیدان‌ها، اسیدهای چرب چند غیراشباعی و غیره می‌شود (۱). اسیدهای چرب امگا ۳، دسته‌ای از اسیدهای چرب غیر اشباعه (معمولاً بیش از دو پیوند دو گانه) می‌باشند که در حفظ سلامت سیستم

کمپلکس‌های محلول بین پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها در صورتی به آسانی صورت می‌گیرد که pH محیط، بین نقطه ایزوالکتریک پروتئین و pKa پلی‌ساکارید باشد؛ زیرا در این صورت، بارهای خالص الکتریکی دو بیوپلیمر، مخالف یکدیگر بوده و جاذبه بین بارهای مخالف، سبب تشکیل کمپلکس می‌شود (اگرچه در مورد پلی‌ساکاریدهایی مانند کاراگینان که دارای گروه اسیدی قوی سولفات است، در بالای PI پروتئین هم، نیروی الکترواستاتیک کافی برای ایجاد کمپلکس وجود دارد). لازم به ذکر است که کمپلکس تشکیل شده در صورتی پایدار و به صورت محلول باقی می‌ماند که مجموع بارهای کمپلکس تشکیل شده خنثی نباشد و بار خالص سطحی با ایجاد دافعه بین ذرات کمپلکس، از به هم پیوستن و توده‌ای شدن ذرات جلوگیری کند (۱۱). در این رابطه، بررسی‌های انجام شده توسط Girard و همکاران بر روی برهمکنش‌های پکتین - بتالاکتوگلوبولین طی تشکیل نانوکمپلکس نشان داد که پیوندهای یونی، هیدروژنی و الکتروستاتیک، اساس این برهمکنش‌ها را تشکیل می‌دهند و در محدوده‌های زیر نقطه ایزوالکتریک پروتئین، و افزودن مقادیر اضافی پکتین، نانوکمپلکس‌های محلول با دافعه الکتروستاتیک قوی ایجاد می‌شود که در نهایت پایداری سیستم کلونیدی را افزایش می‌دهد (۱۱). در تحقیقی دیگر، Luo و همکاران با بررسی نانوکمپلکس‌های کیتوزان - زئین حاوی آلفاتوکوفرول نشان دادند که عامل تشکیل کمپلکس و پایداری سیستم، برهمکنش‌های الکترواستاتیک بین زئین و کیتوزان می‌باشد (۱۲).

همان طور که گفته شد، کمپلکس‌های بیوپلیمری نسبت به بیوپلیمر تنها بهتر می‌توانند از ترکیبات حساس در برابر عوامل نامساعد محیطی محافظت کنند. در این خصوص تحقیقات انجام شده توسط Zimet و همکاران نشان داد که امگا ۳ محصور شده در کمپلکس پکتین کم‌استر - بتا - لاکتوگلوبولین نسبت به امگا ۳ محصور در یک لایه بتالاکتوگلوبولین، به میزان کمتری تحت تأثیر عوامل مخرب محیطی قرار می‌گیرد (۷). علاوه بر این، تحقیقات انجام شده توسط Ron و همکاران در خصوص پایداری و حفاظت ویتامین D₂ محصور در کمپلکس پکتین کم‌استر - بتا - لاکتوگلوبولین این مطلب را تأیید کرد و نشان داد که نانوکمپلکس‌های بیوپلیمری (پکتین - بتالاکتوگلوبولین) نسبت به تک لایه بتالاکتوگلوبولین، پوشش مناسب‌تری برای حفاظت از ویتامین D₂ می‌باشند (۱۳). این محققان همچنین نشان دادند که پایداری ویتامین ریزپوشانی شده نسبت به حالت آزاد در محیط آبی بیشتر است (۱۳ و ۱۴). با توجه به توانایی این بیوپلیمرها در تولید نانوذراتی با اندازه ۵۰-۷۰ نانومتر و پایداری آن‌ها در محیط آبی، Ron و همکاران،

سازی فرآورده‌های غذایی و نوشیدنی‌های آبی با آن بسیار مشکل می‌باشد. این ترکیبات به دلیل داشتن پیوندهای غیر اشباع، شدیداً به تخریب اکسیداتیو حساس و در اثر اکسیداسیون، علاوه بر تولید عطر و طعم نامناسب، اثرات سلامت بخشی آن نیز کاهش می‌یابد. استفاده از نانوحامل‌ها برای انتقال و حفاظت از مواد مغذی محلول در چربی یا به عبارت دیگر انکپسوله کردن این ترکیبات، راهکاری مناسب برای غلبه بر این مشکلات است (۵).

نانوانکپسولاسیون تکنیکی است که در آن حامل‌هایی با اندازه کمتر از ۱ میکرون (و گاهی ۱۰۰ نانومتر) به منظور غنی‌سازی مواد غذایی و انتقال ترکیبات غذا-دارو (نوتریسیوتیکال) و زیست فعال (اسیدهای چرب ضروری، آنتی‌اکسیدان‌ها، کاروتنوئیدها و غیره) به بخش‌های هدف، تولید و مورد استفاده قرار می‌گیرد (۶). جنس نانوکپسول‌ها بسته به موارد استفاده در سیستم‌های غذایی متفاوت است و به دو دسته بیوپلیمری و لیپیدی تقسیم می‌شوند. در تولید نانوحامل‌های بیوپلیمری از پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها و یا کمپلکس آن‌ها استفاده می‌شود (۷). مزایای استفاده از نانوکپسول‌های بیوپلیمری برای ترکیبات غذا-داروی آبگریز شامل افزایش حلالیت ترکیبات آبگریز در نوشیدنی‌ها، حفاظت از این ترکیبات در برابر عوامل مخرب محیطی (مانند اکسیژن، نور)، آزدسازی کنترل شده در مواد غذایی و بدن، جلوگیری از ایجاد طعم و رنگ نامناسب در مواد غذایی و افزایش دسترسی زیستی می‌باشد (۸، ۹).

پروتئین‌های شیر دارای ویژگی‌های عملکردی فراوان هستند و به دو دسته مهم کازئین‌ها و پروتئین‌های آب پنیر تقسیم می‌شوند (۱۰). کازئین ۸۰-۷۵٪ پروتئین شیر را شامل می‌شود که به شکل میسلی در شیر وجود داشته و از چهار بخش اصلی آلفا اس ۱ کازئین، آلفا اس ۲ کازئین، کاپا-کازئین و بتا کازئین تشکیل شده است. این میسل‌ها، کلونید-هایی کروی با اندازه ۵۰-۵۰۰ نانومتر هستند. در صنعت، با افزودن اسیدهای آلی و معدنی به شیر پس‌چرخ کازئین را رسوب می‌دهند و پس از طی مراحل کازئینات تولید می‌شود.

پکتین، هتروپلی‌ساکاریدی آنیونی است که در دیواره سلول گیاهان یافت می‌شود و زنجیر اصلی آن از واحدهای اسید گالاکتورونیک با اتصال آلفا-دی (۴ به ۱) تشکیل شده و به طور نسبی با متانول استری شده است (۱۱).

تحقیقات نشان داده است که کمپلکس بین بیوپلیمرهای پروتئینی و پلی‌ساکاریدی دارای پایداری و کاربرد بیشتری نسبت به بیوپلیمر تنها هستند. علاوه بر آن، به علت حلالیت بالاتر در آب و حفاظت بیشتر از محموله، دارای مزایایی نسبت به کپسول‌های لیپیدی می‌باشند (۷). باید توجه داشت که ایجاد برهمکنش‌های الکتروستاتیک و تشکیل

تهیه محلول‌های پکتینی: مقادیر ۰/۲، ۰/۴۵ و ۰/۷ گرم پودر پکتین به تدریج به آب دو بار تقطیر 80°C - 70°C افزوده و تا حل شدن کامل، به طور مداوم توسط همزن مغناطیسی (مدل Jenway 1000، ساخت انگلستان) همزده شد. محلول‌های حاصل پس از ۱/۵ - ۱ ساعت (سرد شدن) به حجم نهایی ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شدند و به منظور کامل شدن جذب آب پکتین، حداقل به مدت ۸ ساعت قبل از استفاده، در یخچال نگهداری شدند. کلیه محلول‌های مورد استفاده روزانه و به صورت تازه تهیه شدند (۱۳).

تهیه محلول حاوی امگا ۳: برای تهیه محلول ۵۰٪ امگا ۳، مقدار ۷/۵ میلی‌لیتر روغن امگا ۳ در حلال استون-تانول (با نسبت ۱۶ به ۸۴) حل و در نهایت به حجم ۱۵ میلی‌لیتر رسانده شد.

تهیه محلول نانوکمپلکس: پس از تهیه محلول‌های کارژیناتی، مقدار ۴ میلی‌لیتر محلول حاوی ۵۰٪ امگا ۳ به محلول کارژیناتی ۱ و ۱/۵ (w/v) و ۲ میلی‌لیتر محلول امگا ۳ به محلول کارژیناتی ۰/۵ (w/v) افزوده و به مدت ۵ دقیقه با استفاده از همزن‌ایزر و با سرعت ۸۰۰۰ دور بر دقیقه به شدت همزده شد. پس از آن مقدار 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 فواصل زمانی ۱۵ دقیقه به محلول اضافه شدند (۱۶). در این مرحله پس از رساندن محلول به حجم مورد نظر و تنظیم pH در حالت خنثی (با استفاده از NaOH یا HCL ۰/۱ نرمال)، محلول‌های پکتینی از قبل تهیه شده به محلول پروتئینی افزوده شد و تیتراسیون تا pH مورد نظر (۴/۳، ۴/۱ و ۳/۹) با HCL ۰/۱ نرمال انجام شد (۱۳). محلول‌های نانوکمپلکس تهیه شده با غلظت‌های مختلف پکتین و کارژینات سدیم و pH‌های مختلف، در جدول (۱-الف) آورده شده است. کلیه نمونه‌ها در حمام آبی 4°C تهیه شدند.

طیف‌سنجی فرو سرخ (FTIR): برای اندازه‌گیری طیف IR از قرص‌های حاصل از پودرهای خشک شده در دستگاه خشک کن انجمادی تحت خلا (مدل Christ α ۱-۴ ساخت آلمان) استفاده شد. قرص‌های نازک با ضخامت کمتر از ۱ میلی‌متر از اختلاط و آسیاب پودر لیوفیلیزه شده و برمید پتاسیم با نسبت‌های ۱ به ۱۰ و سپس اعمال فشار ۶۰ کیلو پاسکال، به مدت ۲ دقیقه در دستگاه تهیه قرص تهیه شدند و در عدد موجی 4000cm^{-1} - 400cm^{-1} و با قدرت تفکیک 4cm^{-1} در دستگاه FTIR (مدل Shimadzu 8400 S ساخت آلمان)، مورد آنالیز قرار گرفتند (۱۷).

آزمون گرماسنجی اسکنی افتراقی (DSC): اندازه‌گیری‌های DSC در دستگاه DSC (مدل NETZSCH

نانوکمپلکس پکتین - بتالاکتوگلوبولین را برای غنی‌سازی نوشیدنی‌های شفاف بدون چربی (با ترکیبات آبریز نظیر ویتامین D₂) مناسب دانستند (۱۳). Ye و همکاران نیز با بررسی بیوپلیمرهای کارژینات سدیم و صمغ عربی، توانایی این دو بیوپلیمر را در تشکیل نانوکمپلکس‌های پایدار با اندازه ذرات ۱۰۰ - ۲۰۰ نانومتر نشان دادند (۶). در تحقیقی دیگر Bedie و همکاران، اثر عوامل مختلف از جمله نسبت اختلاط دو بیوپلیمر، pH محیط و هم‌چنین روش و زمان اسیدی کردن، قبل و بعد از اختلاط بیوپلیمرها را در تشکیل کمپلکس‌های پکتین (LMP) و پروتئین ایزوله آب پنیر (WPI) حاوی تیامین (ترکیب حساس محلول در آب) مورد مطالعه قرار دادند و نشان دادند که این عوامل بر پایداری، اندازه ذرات و کاهش تخریب تیامین مؤثرند (۱۵). سایر تحقیقات نیز نشان داد که رعایت نسبت مناسب بین بیوپلیمرها و pH محیط، علاوه بر تأثیر بر اندازه ذرات، بر میزان پایداری و عدم توده‌ای شدن کمپلکس‌ها و هم‌چنین جلوگیری از تخریب ترکیب مغذی مؤثر است (۱۳، ۷). علیرغم تحقیقات اخیر در مورد کاربرد کپسولاسیون ترکیبات زیست فعال توسط بیوپلیمرها، پژوهش‌های بسیار اندکی وجود دارد که به کپسولاسیون اسیدهای چرب ضروری توسط کمپلکس‌های بیوپلیمری پرداخته باشد.

هدف از این پژوهش، تولید نانوکپسول‌هایی بر پایه کمپلکس بیوپلیمرهای کارژینات سدیم و پکتین پراستر و ارزیابی کارایی کپسولاسیون آن‌ها برای اسیدهای چرب امگا ۳ بود. برای این منظور از تکنیک‌های مختلفی برای اثبات تشکیل کمپلکس و رسیدن ذرات به محدوده نانو استفاده شد و سپس میزان کپسوله شدن امگا ۳ در ساختار بیوپلیمری توسط کروماتوگرافی گازی اندازه‌گیری شد.

• مواد و روش‌ها

مواد: کارژینات سدیم (۸۸٪ پروتئین) با ۶٪ رطوبت از شرکت DMV هلند و پکتین با درجه متوکسیل بالا از شرکت CP Kelco دانمارک و امگا ۳ غنی شده (حاوی ۶۰٪ اسیدهای چرب ایکوزاهگزانوئیک اسید و دوکوزاهگزانوئیک اسید) از شرکت داروسازی دانا تبریز خریداری شد. نمک‌های تری پتاسیم سیترات، دی پتاسیم هیدروژن فسفات، کلرید کلسیم، اسید کلریدریک، هیدروکسید سدیم، استون و اتانول از شرکت مواد شیمیایی Merck (آلمان) تهیه شدند.

تهیه محلول‌های کارژیناتی: پودر کارژینات سدیم با مقادیر مختلف ۰/۵، ۱ و ۱/۵ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر 4°C حل و به منظور حداکثر جذب آب کارژینات، به مدت ۸ ساعت در دمای یخچال نگهداری شد. پس از آن محلول از کاغذ فیلتر 40 Whatman با استفاده از پمپ خلأ عبور داده شد (۱۳).

اسید با استون در بالون ژوژه به حجم ۱۰ میلی لیتر رسانده شد. پس از آن به منظور انحلال کامل در استون به مدت ۱۰ دقیقه در آن ۶۷°C قرار داده شد. برای استخراج امگا ۳ از پودرهای کمپلکس، به میزان ۲۰ میلی گرم و مدت ۱۰ دقیقه در ۵ میلی لیتر استون استفاده شد. این ترکیب مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ (۲۰۰۰ rpm و توان ۴۰ وات) و سپس محلول رویی حاوی امگا ۳، از مواد جامد ته نشین شده (کمپلکس کازئینات-پکتین) جدا و برای مشتق سازی، ۱ میلی لیتر کمپلکس بورتی فلورید متانول به آن اضافه شد و به مدت ۴۵ دقیقه در آن ۸۰°C قرار گرفت. پس از سرد شدن نمونه ها، ۱ میلی لیتر هیدروکسید سدیم ۲ نرمال و در نهایت ۱ میلی لیتر n-هگزان به نمونه ها اضافه شد و پس از ۵ دقیقه سانتریفوژ، فاز رویی به دقت جدا شده و به GC تزریق شد. برای تهیه نمونه استاندارد مقدار ۲۰ میلی گرم از روغن امگا ۳ با استون به حجم ۲۰ میلی لیتر رسید و ۲ میلی لیتر از این محلول به لوله ویال منتقل شد. بقیه مراحل مشتق سازی همانند سایر نمونه های کمپلکس انجام شد.

محاسبه کارایی انکپسولاسیون: به منظور بررسی درصد امگا ۳ کپسوله شده در کپسول های کازئینات-پکتین، ابتدا مقادیر امگا ۳ آزاد در محلول، از طریق سانتریفوژ دور پایین (۱۰۰۰ rpm) به مدت ۱۰ دقیقه جداسازی و بقیه محلول حاوی کمپلکس کازئینات-پکتین-امگا ۳ در دستگاه خشک کن انجمادی تحت خلا خشک شد. مقدار امگا ۳ کپسوله شده از طریق کروماتوگرافی گازی ارزیابی شد. کارایی کپسولاسیون توسط رابطه زیر تعیین گردید (۷):

معادله (۳)

$$\text{کارایی کپسولاسیون} = \frac{\text{کل امگا ۳ افزوده شده} - \text{امگا ۳ آزاد}}{\text{کل امگا ۳ افزوده شده}} = \frac{\text{کل امگا ۳ کپسوله شده}}{\text{کل امگا ۳ افزوده شده}}$$

تجزیه و تحلیل آماری: در این تحقیق از آنالیز آماری فاکتوریل سطح پاسخ Box-bhenken و نرم افزار minitab 15 برای آنالیز اندازه ذرات استفاده شد. داده های به دست آمده از سایر آزمون ها با استفاده از نرم افزار Excel مورد پردازش قرار گرفت. کلیه آزمون ها در سه تکرار انجام شدند.

• یافته ها

اندازه ذرات: کاهش اندازه ذرات به مقیاس نانومتری موجب افزایش ویژگی های مطلوب نظیر پایداری، شفافیت و کارایی انکپسولاسیون سیستم می شود. در ابتدا به منظور یافتن فرمولاسیونی مناسب با اندازه ذرات نانو، از غلظت های مختلف پکتین (۰/۲، ۰/۴۵، ۰/۷ و ۰/۱)، کازئینات (۰/۵، ۱ و ۱/۵) و pH های مختلف (۳/۹، ۴/۱، ۴/۳)، برای ساخت نانوکمپلکس کازئینات-پکتین استفاده شد. نتایج مربوط به قطر متوسط و توزیع اندازه ذره ای نانوکمپلکس های تولید شده در جدول (۱-الف) گزارش شده است. نتایج جدول و

کالیبراسیون 200 F 3 Maia ساخت آلمان) انجام شد. کالیبراسیون دستگاه توسط ایندیوم صورت گرفت. ظرف آلومینیومی خالی به عنوان مرجع مورد استفاده قرار گرفت. نمونه های با وزن تقریبی ۰/۵ گرم با سرعت ۳۰°C/min در گستره دمایی ۵۰ تا ۳۰۰ درجه سانتی گراد اسکن شدند. آنالیز کمپلکس کازئینات-پکتین حاوی امگا ۳ در گستره دمایی ۳۰۰-۵۰- درجه سانتی گراد انجام شد [۱۲].

تعیین اندازه ذرات: توزیع اندازه ذرات و قطر متوسط آن ها در دستگاه آنالیز کننده اندازه ذرات (مدل SALD 2101 Shimadzu ساخت ژاپن) بر اساس روش تفرق نور لیزر اندازه گیری شد. متوسط اندازه ذرات بر اساس میانگین قطر حجمی تعیین شدند و کلیه نمونه ها در سه تکرار اندازه گیری شدند.

میانگین قطر حجمی (میانگین حجم معادل) یا DeBroukere mean

$$\bar{D}[4,3] = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3} \quad \text{معادله (۱)}$$

توزیع اندازه ذرات با استفاده از معادله زیر محاسبه شد:

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

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

اندازه گیری کدورت: کدورت کمپلکس های بیوپلیمری حاوی امگا ۳ و بدون آن، در دستگاه کدورت سنج Heidolph (مدل TN-100 ساخت آلمان) و در عدد موج ۶۰۰ نانومتر اندازه گیری شدند (۱۳).

تعیین مقدار DHA توسط کروماتوگرافی گازی (GC): آنالیز متیل استرهای اسیدهای چرب با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی (مدل 2010 PLUS ساخت آلمان) مجهز به دکتور mass spectrometry و ستون Sol Gel-1ms با طول ۳۰ متر و قطر ۰/۳۲ متر در بخش R&D کارخانه تکدانه مرند انجام شد. اسیدهای چرب، با مقایسه پیک های حاصله و زمان احتباس مربوطه با مقادیر متناظر (Rt; Retention time) اسیدهای چرب استاندارد شناسایی و مقادیر کمی آن ها از طریق مقایسه مساحت زیر پیک اسیدهای چرب نمونه و استاندارد داخلی تعیین شد. برای تهیه محلول استاندارد داخلی، ۵۰ میلی گرم هپتادکانوئیک

ذرات را از ۶۳۹ نانومتر در کمپلکس ۱٪ کاربونات و پکتین ۰/۲٪ به ۱۲۳۰۳/۵ نانومتر افزایش داد. در حالی که، در غلظت بالای پکتین (۰/۷٪)، نتیجه عکس مشاهده شد و کاهش pH، سبب کاهش در اندازه ذرات شد (جدول ۱-الف). با توجه به جدول ۱-ب مشاهده شد که این اختلاف از نظر آماری در سطح ۰/۰۱ معنی دار است ($P=0/0001$). نتایج نشان دادند که کلیه پارامترها (غلظت کاربونات سدیم، پکتین و pH)، بر توزیع اندازه ذره‌ای به طور معنی‌داری (در سطح ۰/۰۵) مؤثرند: به طوریکه افزایش غلظت کاربونات سدیم و کاهش پکتین در pHهای اسیدی‌تر، توزیع اندازه ذرات را افزایش می‌دهد اما اثر متقابل بین این پارامترها در سطح ۰/۰۵ معنی دار نبود (جدول ۱-ب).

بررسی اثر نسبت‌های مختلف کاربونات - پکتین در اندازه ذرات کمپلکس در pH=۴/۱ نشان داد که در غلظت‌های ثابت ۱/۵٪ کاربونات سدیم، کاهش غلظت پکتین از ۰/۷٪ به ۰/۲٪ موجب افزایش شدید در اندازه ذرات از ۱۰۹۴ نانومتر به ۱۲۰۲۵ نانومتر شد؛ در حالیکه در مقادیر کم‌تر کاربونات سدیم (۰/۵٪)، کاهش غلظت پکتین، اندازه ذرات را از ۲۲۰۰ نانومتر به ۱۵۰ نانومتر کاهش داد. این اختلاف از نظر آماری در سطح ۰/۰۱ معنی‌دار بود (جدول ۱-ب).

بررسی اثر متقابل بین پکتین و pH، در مقادیر ثابت کاربونات سدیم نیز نشان داد که در مقادیر ثابت کاربونات سدیم ۱٪، بسته به pH مورد استفاده، پکتین دارای اثرات متفاوتی بر اندازه ذرات می‌باشد؛ به طوری که در غلظت‌های کم پکتین (۰/۲٪)، کاهش pH از ۴/۳ به ۳/۹ شدت اندازه

جدول ۱. الف - اندازه و توزیع اندازه ذره‌ای در غلظت‌های مختلف کاربونات سدیم، پکتین و pH

| اسپین | میانگین قطر حجمی (nm) ± انحراف معیار | C | B | A | |
|------------------------|--------------------------------------|------|-----|-----|----|
| ۰/۰۲± ۵/۸۲ | ۵۸± ۶۴۸ | ۰/۲ | ۱ | ۴/۳ | ۱ |
| ۰/۱۵± ۳/۰۹ | ۲۳۰± ۱۰۵۲۹ | ۰/۲ | ۱ | ۳/۹ | ۲ |
| ۰/۰۳± ۱/۳۳ | ۲۵± ۷۲۳ | ۰/۷ | ۱ | ۴/۳ | ۳ |
| ۰/۰۲± ۰/۹۳ | ۵± ۸۶ | ۰/۴۵ | ۱ | ۴/۱ | ۴ |
| ۰/۰۱± ۴/۸۴ | ۱۴۹± ۱۶۴۵ | ۰/۴۵ | ۰/۵ | ۴/۳ | ۵ |
| ۰/۰۲± ۴/۶۲ | ۱۰۳± ۲۲۰۰ | ۰/۷ | ۰/۵ | ۴/۱ | ۶ |
| ۰/۰۲± ۵/۹۵ | ۱۴۱± ۱۷۴۳ | ۰/۴۵ | ۰/۵ | ۳/۹ | ۷ |
| ۰/۰۶± ۲/۸۵ | ۱۰۸± ۶۱۵۷ | ۰/۴۵ | ۱/۵ | ۳/۹ | ۸ |
| ۰/۶۷± ۰/۸۹ | ۶± ۹۹ | ۰/۴۵ | ۱ | ۴/۱ | ۹ |
| ۰/۱۲± ۴/۹۰ | ۴۴± ۶۳۹ | ۰/۲ | ۱ | ۴/۳ | ۱۰ |
| ۰/۵۳± ۰/۹۳ | ۸± ۹۳ | ۰/۴۵ | ۱ | ۴/۱ | ۱۱ |
| ۰/۰۵± ۰/۸۷ | ۵± ۸۶ | ۰/۴۵ | ۱ | ۴/۱ | ۱۲ |
| ۰/۰۱± ۰/۸۳ | ۸± ۳۸۰ | ۰/۷ | ۱ | ۳/۹ | ۱۳ |
| ۰/۰۹± ۴/۴۲ | ۸۶± ۲۱۰۰ | ۰/۷ | ۰/۵ | ۴/۱ | ۱۴ |
| ۰/۱۵± ۰/۷۹ | ۷۲± ۱۰۹۴ | ۰/۷ | ۱/۵ | ۴/۱ | ۱۵ |
| ۰/۲۳± ۴/۵۸ | ۴۲۸± ۲۲۱۸ | ۰/۴۵ | ۰/۵ | ۴/۳ | ۱۶ |
| ۰/۱۵± ۰/۸۳ | ۵۴± ۷۹۳ | ۰/۷ | ۱ | ۴/۳ | ۱۷ |
| ۰/۰۰± ۲/۶۷ | ۳۰۵± ۱۵۰ | ۰/۲ | ۰/۵ | ۴/۱ | ۱۸ |
| ۰/۰۱± ۲/۸۴ | ۳۳۷± ۱۲۰۲۵ | ۰/۲ | ۱/۵ | ۴/۱ | ۱۹ |
| ۰/۰۱± ۰/۹۶ | ۶± ۹۳ | ۰/۴۵ | ۱ | ۴/۱ | ۲۰ |
| ۰/۰۰± ۰/۷۶ | ۱۱± ۶۲۲ | ۰/۴۵ | ۱ | ۴/۳ | ۲۱ |
| ۰/۰۳± ۰/۷۸ | ۶۴± ۶۲۶ | ۰/۴۵ | ۱ | ۴/۳ | ۲۲ |
| ۰/۰۶± ۲/۹۰ | ۱۸۴± ۱۲۳۰۳ | ۰/۲ | ۱ | ۳/۹ | ۲۳ |
| ۰/۰۹± ۰/۷۱ | ۱± ۹۴ | ۰/۴۵ | ۱ | ۴/۱ | ۲۴ |
| ۰/۲۴± ۰/۸۳ | ۳۸± ۱۱۹ | ۰/۷ | ۱/۵ | ۴/۱ | ۲۵ |
| ۰/۰۱± ۰/۸۸ | ۲± ۳۲۲ | ۰/۷ | ۱ | ۳/۹ | ۲۶ |
| ۰/۰۸± ۲/۸۴ | ۸۴۸± ۱۲۰۶۹ | ۰/۲ | ۱/۵ | ۴/۱ | ۲۷ |
| ۰/۰۴± ۵/۹۵ | ۱۴۰± ۱۷۵۸ | ۰/۴۵ | ۰/۵ | ۳/۹ | ۲۸ |
| ۰/۲۹± ۲/۸۴ | ۴۰۹± ۵۹۲۱ | ۰/۴۵ | ۱/۵ | ۳/۹ | ۲۹ |
| ۰/۰۰± ۲/۶۷ | ۲۱۸± ۱۵۰ | ۰/۲ | ۰/۵ | ۴/۱ | ۳۰ |
| حاوی امگا ۳ ۰/۰۲± ۰/۹۸ | ۱۱۸± ۷ | ۰/۴۵ | ۱ | ۴/۱ | ۳۱ |

A: pH، B: کاربونات سدیم و C: پکتین

جدول ۱. ب - ضرایب رگرسیونی و سطوح معنی دار برای پارامترهای مختلف پکتین، کازئینات سدیم، pH و اثر متقابل بین آن‌ها بر اندازه و توزیع اندازه ذرات

| توزیع اندازه ذرات | | | اندازه ذرات | | | |
|-------------------|---------|--------------|-------------|--------|--------------|-------------------------------|
| ارزش P | ارزش T | ضریب همبستگی | ارزش P | ارزش T | ضریب همبستگی | |
| ۰/۰۵۳ | ۲/۰۶۱ | ۰/۸۸۴۷ | ۰/۸۴۲ | ۰/۲۰۲ | ۹۱/۸۳ | ثابت معادله |
| ۰/۷۳۵ | -۰/۰۳۴۳ | -۰/۰۹۰۰۶ | ۰/۰۰۰۱ | -۶/۹۹۵ | -۱۹۹۴/۹۴ | pH |
| ۰/۰۰۰۱ | -۵/۰۳۵ | -۱/۳۲۳۶ | ۰/۰۰۰۱ | ۶/۲۰۴ | ۱۷۲۹/۳۱ | کازئینات سدیم |
| ۰/۰۰۵ | -۳/۱۴۲ | -۰/۸۲۵۲۹ | ۰/۰۰۰۱ | -۸/۹۲۰ | -۲۴۸۶/۳۸ | پکتین |
| - | - | - | ۰/۰۳۰ | ۲/۳۴۴ | ۹۶۱/۵۸ | pH×pH |
| - | - | - | ۰/۰۰۱ | ۳/۷۳۶ | ۱۵۳۲/۸۳ | کازئینات سدیم × کازئینات سدیم |
| - | - | - | ۰/۰۰۰۱ | ۵/۴۵۶ | ۲۲۳۸/۷۱ | پکتین × پکتین |
| ۰/۵۸۲ | -۰/۵۵۹ | -۰/۲۰۷۹ | ۰/۰۰۲ | -۳/۵۴۹ | -۱۳۹۹/۰۰ | کازئینات سدیم × pH |
| ۰/۱۶۴ | -۱/۴۴۳ | -۰/۵۳۶۵۳ | ۰/۰۰۰۱ | ۷/۰۹۰ | ۲۷۹۴/۸۸ | پکتین × pH |
| ۰/۰۱۷ | -۲/۶۰۸ | -۰/۹۶۹۶۱ | ۰/۰۰۰۱ | -۸/۲۰۷ | -۳۲۳۵/۱۳ | پکتین × کازئینات سدیم |

با در نظر گرفتن نتایج حاصل از اندازه ذرات و کدورت، بهترین نمونه کمپلکس کازئینات-پکتین، با کمترین اندازه ذره (۸۶ نانومتر) با نسبت‌های کازئینات ۱٪ و پکتین ۰/۴۵٪ و pH=۴/۱ انتخاب (جدول ۱-الف) و روغن امگا ۳ به ترکیب اضافه شد و اثر آن بر اندازه ذرات و میزان کدورت مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان داد که کمپلکس حاوی امگا ۳ دارای کدورت بالاتر از ۱۰۰۰ NTU بود و این کدورت نسبت به کمپلکس بدون امگا ۳ (۴۰۰ NTU)، به طور معنی داری بالاتر بود (جدول ۱-ج). هم‌چنین افزودن امگا ۳ به کمپلکس سبب افزایش جزئی از ۸۶ نانومتر به ۱۱۸ نانومتر در اندازه ذرات شد (جدول ۱-الف). این نمونه‌ها هم‌چنین از نظر میزان پایداری مورد ارزیابی قرار گرفتند و پس از دو ماه در سیستم‌ها رسوبی مشاهده نشد و در طی این مدت زمان، کمپلکس‌ها پایداری خود را حفظ کردند.

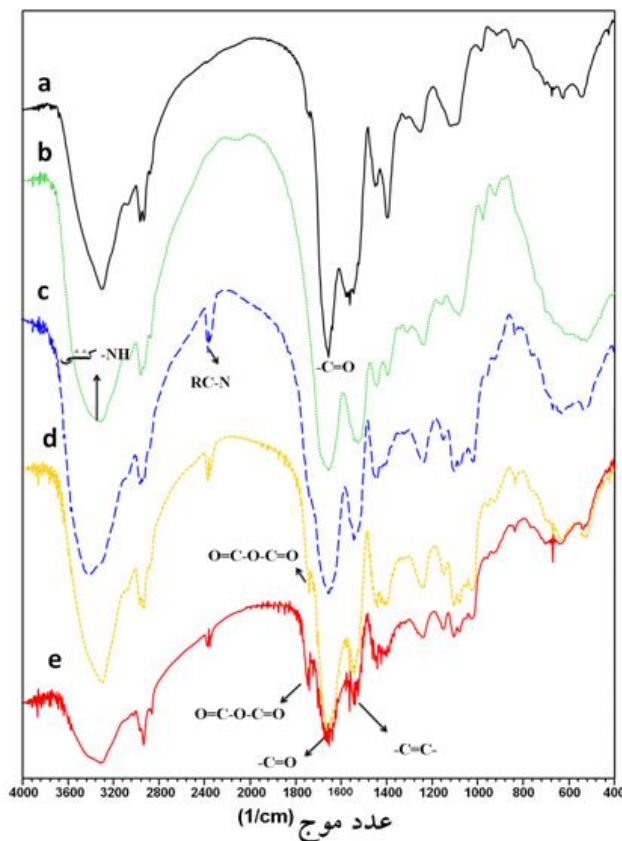
طیف‌سنجی فرو سرخ (FT-IR): آنالیز اسپکتروسکوپی IR، به منظور شناسایی و تشخیص انکپسولاسیون امگا ۳ در کازئینات سدیم، برقراری برهمکنش‌های الکتروستاتیک بین پکتین و کازئینات سدیم حاوی امگا ۳ و یا بدون آن و در نهایت اثر تیمار حرارتی بر کمپلکس کازئینات سدیم-پکتین حاوی امگا ۳ مورد ارزیابی قرار گرفت. پیوندهای هیدروژنی - NH مربوط به کازئینات سدیم، پیک بزرگی در محدوده عدد موج‌های $3300-3100 \text{ cm}^{-1}$ نشان داد (شکل ۱-b). در این محدوده پهن بودن پیک، پیوندهای هیدروژنی قوی در ترکیب را نشان می‌دهد. نتایج حاصل از طیف‌سنجی IR ترکیبات امگا ۳، و محدوده جذب گروه‌های عاملی مختلف، در جدول (۲) نشان داده شده است. با توجه به شکل و مقایسه طیف IR کازئینات (b) و کازئینات حاوی امگا ۳ (a)، مشاهده شد که تقریباً تمامی پیک‌های مربوط به امگا ۳، با

جدول ۱-ج، کدورت محلول‌های حاوی نانوکمپلکس با نسبت‌های مختلف کازئینات سدیم و پکتین، حاوی امگا ۳ و بدون امگا ۳ در pH=۴/۱ را نشان می‌دهد. با توجه به نتایج جدول مشاهده می‌شود که استفاده از غلظت‌های مختلف کازئینات سدیم در مقادیر ثابت پکتین، با اثر بر اندازه ذرات کمپلکس و هم‌چنین پایداری، بر کدورت سیستم‌های حاوی نانوکمپلکس مؤثر است. با افزایش غلظت کازئینات سدیم از ۰/۰۵٪ به ۰/۱۵٪ کدورت سیستم به طور معنی داری (در سطح ۰/۰۵) افزایش می‌یابد (جدول ۱-ج). با توجه به این نتایج بیشترین کدورت در نمونه‌های حاوی ۰/۲٪ پکتین در مقادیر ثابت کازئینات سدیم مشاهده شد. نتایج نشان می‌دهد که استفاده از غلظت‌های مختلف پکتین نیز با اثر بر اندازه ذرات، کدورت سیستم را تغییر داده ولی این تغییرات از نظر آماری معنی دار نمی‌باشد (جدول ۱-ج).

جدول ۱. ج - کدورت نانوکمپلکس‌های کازئینات سدیم - پکتین (حاوی امگا ۳ و بدون امگا ۳) با غلظت‌های مختلف و pH=۴/۱

| کدورت (NTU) | نمونه |
|---------------------|--|
| ۳۶۴ ^a | کمپلکس کازئینات سدیم ۰/۵ - پکتین ۰/۲ |
| ۹۱۰ ^{ab} | کمپلکس کازئینات سدیم ۱ - پکتین ۰/۲ |
| ۱۰۰۰ ^b < | کمپلکس کازئینات سدیم ۱/۵ - پکتین ۰/۲ |
| ۲۹۷ ^a | کمپلکس کازئینات سدیم ۰/۵ - پکتین ۰/۴۵ |
| ۴۰۰ ^{ab} | کمپلکس کازئینات سدیم ۱ - پکتین ۰/۴۵ |
| ۶۶۳ ^b | کمپلکس کازئینات سدیم ۱/۵ - پکتین ۰/۴۵ |
| ۲۳۹ ^a | کمپلکس کازئینات سدیم ۰/۵ - پکتین ۰/۷ |
| ۴۳۵ ^{ab} | کمپلکس کازئینات سدیم ۱ - پکتین ۰/۷ |
| ۶۳۲ ^b | کمپلکس کازئینات سدیم ۱/۵ - پکتین ۰/۷ |
| ۱۰۰۰ ^b < | کمپلکس کازئینات سدیم ۱ - پکتین ۰/۴۵ - امگا ۳ |

غلظت بیوپلیمرها بر حسب درصد وزنی - حجمی می‌باشد. حروف مختلف نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.



شکل ۱. طیف FTIR نمونه‌های a: کازئینات-امگا ۳، b: کازئینات سدیم، c: کمپلکس پکتین-کازئینات، d: کمپلکس پکتین-کازئینات-امگا ۳ و e: کمپلکس پکتین-کازئینات-امگا ۳ با تیمار حرارتی

گرماسنجی اسکنی افتراقی (DSC): شکل (۲) منحنی گرمایشی DSC مربوط به پودرهای خشک شده بیوپلیمرهای پکتین (a) و کازئینات سدیم خالص (b) و هم‌چنین مخلوط خشک این دو بیوپلیمر حاوی امگا ۳ (c) و بدون آن (d) در شرایط اسیدی (pH=۴/۱) و هم‌چنین کازئینات حاوی امگا ۳ (e) را نشان می‌دهد. در همه منحنی‌ها پیک اندوترمیک ذوب مشاهده شد. پیک اندوترمیک مربوط به پکتین و کازئینات خالص به ترتیب در دمای $20.8/4^{\circ}\text{C}$ و $20.6/3^{\circ}\text{C}$ مشاهده شدند که به تفکیک پیوندهای درون مولکولی و ذوب نواحی کریستالی این دو ترکیب مربوط می‌شود. هم‌چنین در آنالیز پکتین، یک پیک اضافه در دمای 126°C مشاهده شد که احتمالاً مربوط به تبخیر و خروج آب‌های پیوسته از ساختار پکتین و یا بخش‌هایی از پلیمر می‌باشد که دارای نظم و اتصالات بین زنجیری کمتری هستند، زیرا پکتین کربوهیدراتی است که تمایل زیادی به ایجاد پیوندهای هیدروژنی با آب دارد. همان‌طور که مشاهده می‌شود با اختلاط محلول‌های ۱٪ کازئینات سدیم و ۰.۴۵٪ پکتین در شرایط اسیدی (pH=۴/۱)، پیک مربوط به پکتین و کازئینات

کپسوله شدن در کازئینات، حذف شده است. هم‌چنین پیک‌های مربوط به عدد موج‌های $3321, 3062, 2968$ و 1522 در کازئینات، به ترتیب به $3295, 3067, 2953$ و 1559 در کازئینات حاوی امگا ۳ انتقال یافتند، علاوه بر این، نتایج طیف‌سنجی نمونه کازئیناتی حاوی امگا ۳، تشکیل پیک تیزتری در عدد موج $3100-3300$ و انحراف آن به سمت راست را نشان داد.

نمودار جذب IR ترکیب کمپلکس کازئینات سدیمپکتین، بدون امگا ۳ (شکل ۱- c) ظهور یک پیک جدید در عدد موج 2339 در اثر ایجاد برهمکنش و هم‌چنین باریک‌تر شدن پیک‌های مربوط به محدوده عدد موج $3100-3500$ و تمایل آن به سمت چپ را نشان داد. تیز شدن پیک در این منطقه تشکیل پیوندهای هیدروژنی ضعیف‌تری را در حالت تشکیل کمپلکس نشان می‌دهد. این پیک در سایر نمونه‌های مربوط به کمپلکس کازئینات-پکتین حاوی امگا ۳ نیز مشاهده می‌شود.

شکل (۱- d)، ترکیب کمپلکس بین بیوپلیمرها به همراه امگا ۳ را نشان می‌دهد. در این نمودار نیز جابه‌جایی پیک‌ها همانند نمودار a بود و علاوه بر آن در این طیف، یک پیک جدید در عدد موج 1783 مشاهده شد.

در ادامه به منظور بررسی اثر تیمار حرارتی بر پایداری امگا ۳، از نمونه پاستور شده کمپلکس حاوی امگا ۳، طیف IR تهیه شد و نتایج آن (شکل ۱- e) کاهش جذب IR در عدد موج 1653 (پیوندهای دوگانه سیس $\text{C}=\text{C}$ - در امگا ۳) و 3012 (گروه‌های عاملی $\text{C}-\text{H}$ متصل به $\text{C}=\text{C}$) را نشان داد. با توجه به طیف‌های a، d و e مشاهده می‌شود که میزان جذب IR در عدد موج 1743 ($\text{C}=\text{C}$ - ارتعاشات کششی مربوط به گروه کربوهیدرات متیل استر - $\text{C}=\text{O}$)، در نمودار a کم، و با افزودن پکتین به ترکیب، این مقدار زیادتر شده است.

جدول ۲. عدد موج‌های مربوط به گروه‌های عاملی موجود در

اسیدهای چرب امگا ۳

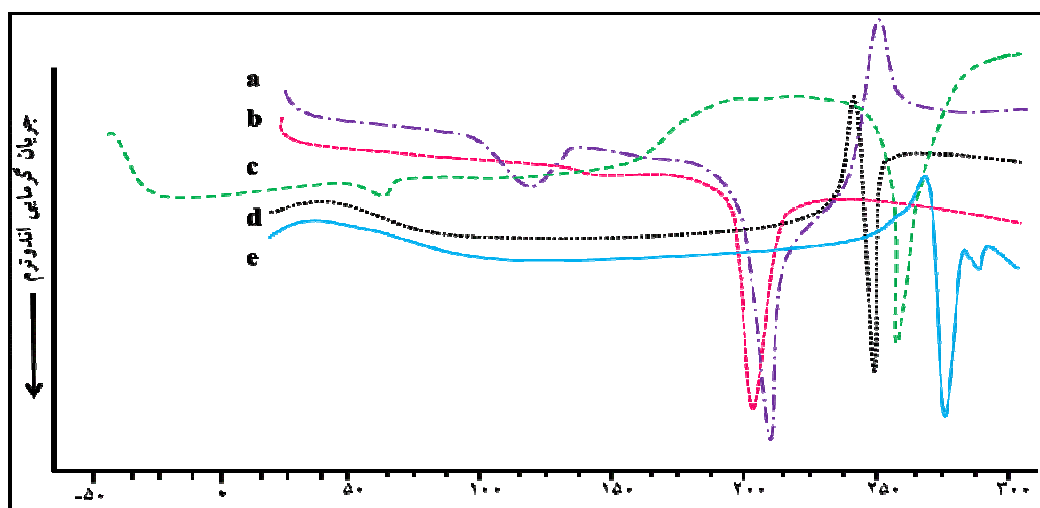
| موقعیت باند (cm^{-1}) | گروه عاملی |
|----------------------------------|--|
| ۳۰۱۲ | $\text{C}=\text{H}$ (سیس، ارتعاشات کششی) |
| ۲۹۵۴ | $\text{C}-\text{H}$ (گروه‌های CH_3 ، ارتعاشات کششی آسیمتریک) |
| ۲۹۲۱ | $\text{C}-\text{H}$ (گروه‌های CH_2 ، ارتعاشات کششی آسیمتریک) |
| ۲۸۵۲ | $\text{C}-\text{H}$ (گروه‌های CH_3 و CH_2 ، ارتعاشات کششی سیمتریک) |
| ۱۷۴۳ | $\text{C}=\text{O}$ (ارتعاشات کششی استری) |
| ۱۶۵۳ | $\text{C}=\text{C}$ (ارتعاشات کششی پیوندهای دوگانه سیس) |
| ۱۴۵۷ | $\text{C}-\text{H}$ (ارتعاشات خمشی) |
| ۱۳۷۶ | $\text{C}-\text{H}$ (ارتعاشات خمشی سیمتریک) |
| ۱۲۳۰ | $\text{C}-\text{O}$ (ارتعاشات کششی) و CH_2 (ارتعاشات خمشی) |
| ۱۱۴۵ | $\text{C}-\text{O}$ (ارتعاشات کششی) |

کارایی انکپسولاسیون اسیدهای چرب امگا ۳: انواع مختلف اسیدهای چرب موجود در مخلوط امگا ۳ تجاری کپسوله شده و کارایی کپسولاسیون نانوکمپلکس‌های مختلف، در جدول (۴) نشان داده شده است. کروماتوگرافی گازی حضور ترکیبات مختلفی از جمله اسید پالمیتیک، اسید اولئیک، اسید استئاریک، ایکوزاهگزانوئیک اسید و دوکوزاهگزانوئیک اسید را در مخلوط امگا ۳ مصرفی نشان داد (شکل ۳). با توجه به نتایج جدول، بالاترین مقدار کپسولاسیون برای نمونه ۲ مشاهده شد. با در نظر گرفتن مقادیر ثابت کارژینات سدیم و تغییر غلظت پکتین، درصد کپسولاسیون متفاوت بوده و همان طور که مشاهده می‌شود؛ بیشترین درصد امگا ۳ به ترتیب در غلظت‌های ۰/۴۵٪، ۰/۷٪ و ۰/۱٪ پکتین و کارژینات سدیم ۱٪ دیده می‌شود. هم‌چنین کارایی کپسولاسیون کمپلکس حاوی ۰/۴۵٪ پکتین و کارژینات سدیم ۱٪، با کاهش مقدار کارژینات سدیم به ۰/۵٪، از ۷۵/۶۵ به ۲۷/۷۶٪ کاهش یافت.

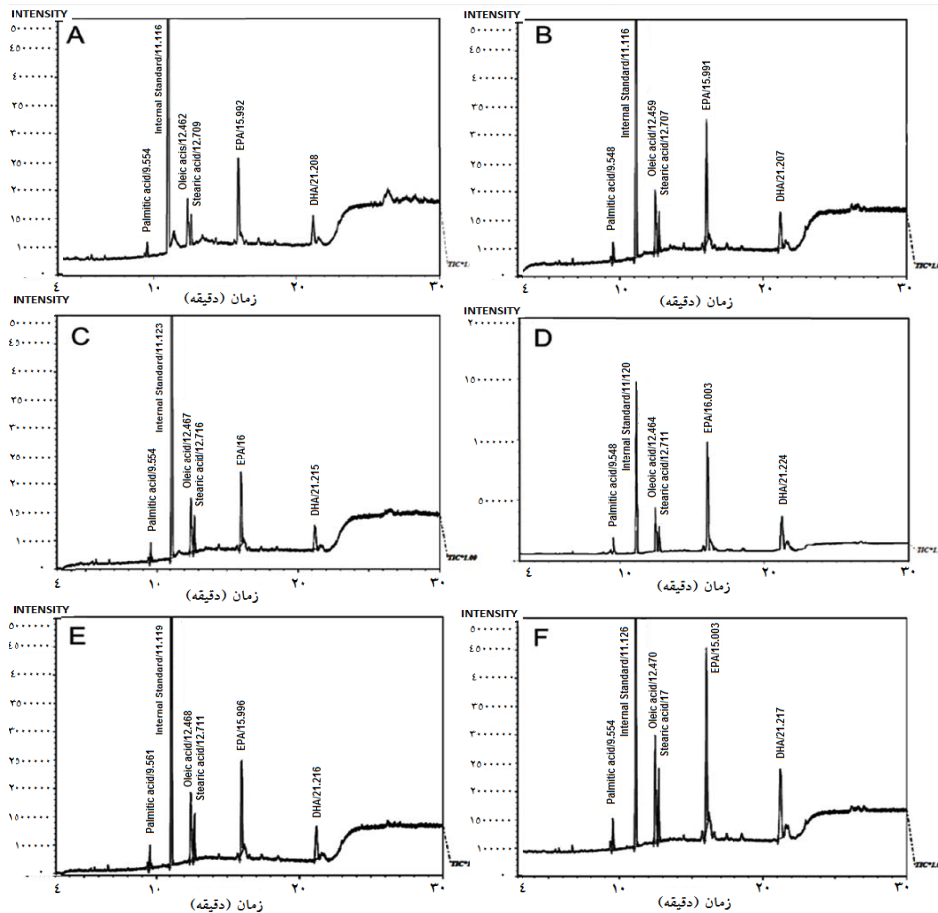
خالص حذف شده و مخلوط این دو، یک پیک جدید را در دمای $248/7^{\circ}\text{C}$ نشان می‌دهد (شکل ۲-d). آنالیز DSC برای نمونه کمپلکس حاوی امگا ۳ از دمای 45°C (کمتر از دمای ذوب امگا ۳) تا 300°C انجام شد. در این نمودار نیز تنها یک پیک ذوب وجود دارد و پیک مربوط به ذوب امگا ۳ در آن دیده نمی‌شود و با توجه به شکل، با کپسولاسیون امگا ۳، دمای ذوب کمپلکس افزایش یافته است. بیشترین نقطه ذوب مربوط به نمونه کارژیناتی-امگا ۳ (بدون پکتین) می‌باشد. علاوه بر آن، در این ترکیب، یک پیک کوچک اندوترمیک در دمای حدود 280°C مشاهده شد. نتایج مربوط به دمای انتقال شیشه‌ای، آنتالپی و دمای ذوب نمونه‌های مورد نظر در جدول (۳) آورده شده است و همان طور که مشاهده می‌شود، ایجاد کمپلکس بین پکتین و کارژینات و هم‌چنین انکپسولاسیون امگا ۳ در کمپلکس، دمای انتقال شیشه‌ای و آنتالپی ذوب را به دلیل کاهش وزن مولکولی متوسط نمونه کمپلکس نسبت به مواد خام اولیه و هم‌چنین افزایش حجم آزاد و فضاهای خالی کمپلکس، کاهش داد.

جدول ۳. دمای ذوب، انتقال شیشه‌ای و آنتالپی ذوب محلول‌های بیوپلیمری و کمپلکس حاوی امگا ۳ و بدون آن

| نمونه | علامت اختصاری | دمای ذوب ($^{\circ}\text{C}$) | دمای انتقال شیشه‌ای ($^{\circ}\text{C}$) | آنتالپی ذوب (J/kg) |
|-------------------------------------|---------------|---------------------------------|--|--------------------|
| پکتین | A | ۲۰۸/۴ | ۷۷/۱ | - |
| کارژینات سدیم | B | ۲۰۶/۳ | ۱۱۷/۹ | -۸۲/۳۳ |
| کارژینات سدیم ۱٪-پکتین ۰/۴۵٪ | D | ۲۴۸/۷ | ۶۸/۴ | -۷۵ |
| کارژینات سدیم ۱٪-پکتین ۰/۴۵٪-امگا ۳ | C | ۲۶۰/۷ | ۵۷/۸ | -۵۴/۳۳ |
| کارژینات سدیم ۱٪-امگا ۳ | E | ۲۷۵/۳ | - | -۱۶/۸۴ |



شکل ۲. منحنی‌های گرمایی: a: پکتین، b: کارژینات سدیم، c: کمپلکس‌های پکتین - کارژینات سدیم حاوی امگا ۳، d: کمپلکس‌های پکتین - کارژینات سدیم (۰/۴۵ - ۱) بدون امگا ۳ و e: کارژینات سدیم حاوی امگا ۳



شکل ۳. آنالیز کروماتوگرافی گازی A: نمونه استاندارد، کمپلکس‌های کازئینات-پکتین با نسبت‌های B: (۰/۲-۱)، C: (۰/۲-۰/۵)، D: (۰/۴۵-۱)، E: (۰/۴۵-۰/۵) و F: (۰/۷-۱)

جدول ۴. ترکیبات شناخته شده در ساختار امگا ۳ و کارایی کپسولاسیون برای کمپلکس‌های بیوپلیمری

| کارایی کپسولاسیون امگا ۳ (% w/w) (DHA+EPA) | کل اسیدهای چرب کپسوله شده (% w/w) | DHA+EPA (% w/w) | DHA (% w/w) | EPA (% w/w) | اسید استئاریک (% w/w) | اسید اولئیک (% w/w) | اسید پالمیتیک (% w/w) | B | A |
|--|-----------------------------------|-----------------|-------------|-------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|------|-----|
| ۱۸/۴ | ۲۳ | ۱۹/۰۲ | ۶/۹ | ۱۲/۱۲ | ۰/۹۵ | ۲/۰۳ | ۱ | ۰/۲ | ۱ |
| ۷۵/۶۵ | ۹۰/۷۲ | ۷۹/۸۳ | ۳۱/۰۹ | ۴۸/۷۴ | ۲/۵۸ | ۵/۷۸ | ۲/۵۳ | ۰/۴۵ | ۱ |
| ۳۴ | ۳۸/۵۳ | ۳۱/۶ | ۱۳/۰۴ | ۱۸/۵۶ | ۱/۶۹ | ۳/۵۳ | ۱/۷۱ | ۰/۷ | ۱ |
| ۱۲/۸ | ۱۵/۴۸ | ۱۱/۸۶ | ۴/۵۸ | ۷/۲۸ | ۰/۹ | ۱/۷۸ | ۰/۹۴ | ۰/۲ | ۰/۵ |
| ۲۷/۷۶ | ۳۰/۶۲ | ۲۳/۷۷ | ۹/۹۷ | ۱۳/۸ | ۱/۷۷ | ۳/۳۴ | ۱/۷۴ | ۰/۴۵ | ۰/۵ |

A: کازئینات سدیم، B: پکتین، EPA: ایکوزاهگزانوئیک اسید و DHA: دوکوزاهگزانوئیک اسید

• بحث

انبوهش در بلند مدت برخوردار نیست و نهایتاً تشکیل رسوب می‌دهد. پلی‌ساکاریدها از جمله پکتین، با ایجاد دافعه الکترواستاتیکی ناشی از بارهای منفی و هم‌چنین دافعه فضایی ناشی از رشته‌های پکتینی، می‌توانند از توده‌ای شدن کازئینات و تشکیل رسوب در شرایط اسیدی جلوگیری کرده و موجب کاهش در اندازه ذرات شوند. با توجه به نتایج

اندازه ذرات و توزیع اندازه ذرات: نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که در محیط اسیدی، حضور پکتین برای پایداری و کاهش اندازه ذرات کمپلکس لازم است زیرا کازئینات با اسیدی شدن محیط و کاهش pH تا کمتر از ۴/۶ (نقطه ایزوالکتریک)، بار الکتریکی مثبت پیدا می‌کند که به اندازه کافی از نیروی دافعه الکترواستاتیک برای جلوگیری از

شدن، نزدیک نقطه خنثی شدن نسبت داده شد (۱۳). تحقیقات انجام شده توسط Zimet و همکاران، بر روی کمپلکس پکتین-بتالاکتوگلوبولین حاوی اسید چرب DHA، نشان داد که افزایش غلظت پکتین تا حد معینی، باعث کاهش اندازه کمپلکس حاصل می‌شود و ذرات با کمترین قطر (۱۱۰ نانومتر) در غلظت بین ۰/۳۷۵ و ۰/۱۲۵ درصد پکتین حاصل می‌شوند و در غلظت‌های بالاتر از ۰/۱۲۵ درصد دوباره قطر افزایش می‌یابد (۷). بررسی‌های انجام شده روی برهمکنش‌های پکتین کم‌استر-بتالاکتوگلوبولین طی تشکیل نانوکمپلکس، نشان داد که اساس برهمکنش‌ها، پیوندهای یونی و هیدروژنی است و در $pH=4/5$ بیشترین تمایل برای تشکیل کمپلکس بین پروتئین و LMP وجود دارد (۱۱). هم‌چنین مشخص شد که در محدوده pH زیر نقطه ایزوالکتریک بتالاکتوگلوبولین ($PI=5/18$) که پروتئین دارای بار مثبت می‌باشد، با افزودن مقادیر اضافی پکتین با بار منفی می‌توان نانوکمپلکس‌های محلول با دافعه الکتروستاتیک قوی ایجاد کرد (۱۱). در پژوهشی تشکیل کمپلکس‌های پکتین (LMP) و پروتئین ایزوله شده آب پنیر (WPI) حاوی تیمین (ترکیب حساس محلول در آب) در غذاهای اسیدی، مورد مطالعه قرار گرفت و مشخص شد که برهمکنش‌های الکتروستاتیک برای تشکیل کمپلکس‌های WPI و LMP، شدیداً به نسبت اختلاط دو بیوپلیمر وابسته است. طبق نتایج به دست آمده، بیشترین تعداد کمپلکس با اختلاط محلول‌های بیوپلیمری با نسبت ۱:۲ برای پروتئین-پلی‌ساکارید گزارش شد (۱۵). بررسی‌های انجام شده بر روی کمپلکس زئین-کیتوزان حاوی توکوفرول نیز نشان داد که افزودن کیتوزان به محلول زئینی به نسبت ۱-۲۰، سبب کاهش اندازه ذرات از ۸۰۰ به ۲۱۱ نانومتر شده و با تغییر این نسبت به ۱-۱۰ و ۱-۵، اندازه ذرات افزایش می‌یابد (۱۲). هم‌چنین گزارش شد که افزایش غلظت پروتئین زئین تا ۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (نسبت ۱-۱۰ زئین-کیتوزان)، اندازه ذرات را کاهش داده و افزایش بیشتر غلظت آن تا ۲۰ میلی‌گرم سبب افزایش در اندازه ذرات شد (۱۲). با توجه به پژوهش‌های انجام شده در این زمینه می‌توان نتیجه گرفت که رعایت نسبت مناسب بین بیوپلیمرها از عوامل مهم و تأثیرگذار در بهینه‌سازی اندازه ذرات کمپلکس می‌باشد. بررسی‌های انجام شده بر روی اثر pH بر برهمکنش‌های پکتین و کارژین نشان داد که با نزدیک شدن pH نوشیدنی اسیدی شیر به pKa پکتین (۳/۵)، احتمالاً تمایل پکتین برای جذب شدن در سطح ذرات کارژین، به دلیل کاهش بار الکتریکی سطحی آن، کاهش می‌یابد (۲۰). همان‌طور که در این تحقیق مشاهده شد، غلظت ۰/۴۵٪ پکتین با ۱٪

حاصل از اندازه ذرات، می‌توان گفت که تشکیل کمپلکس‌های کوچک با حداکثر پایداری در صورتی امکان‌پذیر است که نسبت مناسبی از غلظت بیوپلیمرها انتخاب شوند. برای تشکیل کمپلکس‌های بیوپلیمری پایدار، پکتین باید بتواند به طور کامل سطح کارژینات را بپوشاند و همان‌طور که در جدول (۱-الف) مشاهده شد، برای تولید کمپلکس‌های ریزتر در غلظت‌های بالای کارژینات سدیم (۰/۱۵٪)، مقدار پکتین بیشتری نیاز است زیرا احتمالاً کاهش مقدار پکتین، سبب عدم پوشش‌دهی کامل کارژینات شده و هم‌چنین ایجاد پل پکتینی بین دو یا چند مولکول کارژینات، توده‌ای شدن و در نتیجه افزایش اندازه ذرات رخ می‌دهد. در غلظت‌های کم کارژینات سدیم، افزایش مقدار پکتین احتمالاً موجب جذب نشدن تمامی پکتین در سطح کارژینات و آزاد ماندن آن در حلال می‌شود. غلظت بالای غلظت بحرانی انبوهش CFC (Critical flocculation concentration) موضوع سبب افزایش فشار اسمزی شده و لایه آب بین دو مولکول کارژینات تخلیه می‌شود و در نتیجه مولکول‌ها به هم پیوسته و انبوهش ناشی از تهی‌شدن (Depletion flocculation) رخ می‌دهد که در نهایت اندازه ذرات را نیز افزایش می‌دهد (۱۸).

علاوه بر نسبت بین بیوپلیمرها، pH نیز بر روی اندازه ذرات تأثیرگذار است. pH محیط بر چگالی بار سطحی ذرات اثر گذاشته و در مقادیر کم پکتین نقش مهم‌تری را ایفا می‌کند بطوریکه در غلظت‌های کم پکتین، کاهش pH به شدت اندازه ذرات را افزایش می‌دهد. در این شرایط کاهش مقادیر جزئی در چگالی بار منفی پکتین، منجر به ایجاد برهمکنش نامناسب با کارژینات می‌شود. اما در مقادیر بالاتر پکتین، نتیجه عکس مشاهده شد و کاهش pH اندازه ذرات را کاهش داد، زیرا افزایش غلظت پکتین، چگالی بار منفی کل را افزایش داده و از این طریق سبب افزایش پایداری سیستم می‌شود (۱۸، ۱۹). اخیراً در تحقیق مشابهی، اثر پکتین کم-استر بر تشکیل و اندازه ذرات کمپلکس پکتین و بتالاکتوگلوبولین مورد بررسی قرار گرفته است و گزارش شده است که پکتین در مقادیر بالای ۰/۰۱ درصد در محیط اسیدی، با ایجاد برهمکنش‌های الکترواستاتیک سبب پایداری و کاهش اندازه ذرات کمپلکس می‌شود. در این تحقیق، حداقل اندازه ذرات (۴۹-۵۰ نانومتر) در $pH=4/25$ و غلظت پکتین ۰/۰۵ و ۰/۰۷۵ درصد به دست آمد و خارج از این محدوده غلظت، اندازه ذرات افزایش یافت. با افزایش pH به ۴/۵ (نزدیک نقطه ایزوالکتریک پروتئین) اندازه ذرات به غلظت پکتین وابستگی بیشتری نشان داد که به وابستگی بیشتر پروتئین به حضور پکتین، برای جلوگیری از لخته

c، مشاهده می‌شود که پیک جدیدی در عدد موج cm^{-1} ۲۳۳۹ ایجاد شده است و با توجه به اینکه این پیک تنها در نمونه‌های کمپلکس (حاوی امگا ۳ و بدون امگا ۳) مشاهده شده است؛ می‌توان این پدیده (ظهور پیک جدید) را به ایجاد برهمکنش‌های الکتروستاتیک بین گروه‌های COO^- پکتین و NH_3^+ کازئینات نسبت داد. علاوه بر این مشاهده می‌شود که پیک‌های مربوط به عدد موج محدوده cm^{-1} ۳۱۰۰-۳۵۰۰ در نمونه کمپلکس، باریک‌تر شده و به سمت چپ متمایل شده است که نشان‌دهنده کاهش پیوندهای هیدروژنی در حالت تشکیل کمپلکس است (شکل ۱). در این خصوص Grenha و همکاران، با بررسی طیف IR نانوکمپلکس کیتوزان-کاراگینان، ظهور پیک جدید در عدد موج cm^{-1} ۱۵۳۰ (مربوط به گروه NH_3^+) (عدم مشاهده این پیک در بیوپلیمرهای خالص) و همچنین جابه‌جایی پیک‌های مربوط به گروه‌های آمیدی در حالت تشکیل کمپلکس را به ایجاد برهمکنش الکتروستاتیک بین گروه‌های ناهمنام کیتوزان و کاراگینان نسبت دادند (۲۳). مطالعات انجام شده توسط Li و همکاران نیز نشان داد که برهمکنش بین کیتوزان و آلژینات موجب جابه‌جایی پیک‌های نامتقارن و متقارن گروه‌های کربوکسیلات از عدددهای موجی cm^{-1} ۱۶۱۷ و cm^{-1} ۱۴۱۷ به cm^{-1} ۱۶۳۷ و cm^{-1} ۱۴۱۵ و همچنین جابه‌جایی پیک مربوط به عدد موج cm^{-1} ۱۵۹۹ کیتوزان به cm^{-1} ۱۵۵۹ شده است (۲۴). Honary و همکاران، با بررسی میکروذرات کیتوزان و آلژینات با استفاده از روش FTIR، شاهد ناپدید شدن پیک‌های مربوط به ارتعاشات خمشی گروه N-H آمید نوع دوم کیتوزان، در عدد موجی cm^{-1} ۱۵۷۰ و ارتعاشات کششی متقارن و نامتقارن C-O در cm^{-1} ۱۴۷۰ با ایجاد برهمکنش‌های الکتروستاتیک بین NH_3^+ کیتوزان و COO^- آلژینات بودند (۱۷). در این تحقیق همچنین، اثر کیتوزان با وزن مولکولی مختلف بر تشکیل کمپلکس بررسی شد و نشان داد که ایجاد پیوند هیدروژنی قوی‌تر (با افزایش وزن مولکولی کیتوزان) پهنای پیک محدوده عدد موجی cm^{-1} ۳۱۰۰-۳۵۰۰ را افزایش می‌دهد (۱۷). Dudhani و همکاران، با بررسی طیف IR نانوذرات کیتوزان حاوی کاتکین، گزارش کردند که با برهمکنش بین کاتکین و گروه آزاد آمینی کیتوزان، پیوندهای هیدروژنی افزایش یافته و سبب افزایش پهنای پیک عدد موجی cm^{-1} ۳۳۶۷ و جابه‌جایی آن به cm^{-1} ۳۱۰۰ می‌شود (۲۵). با توجه به این نتایج می‌توان گفت که هرگونه تغییر در پیک‌های مربوط به طیف IR نمونه‌های کمپلکس (جابه‌جایی پیک، ظهور پیک جدید یا ناپدید شدن آن) می‌تواند دلیلی بر ایجاد برهمکنش بین بیوپلیمرها باشد.

کازئینات سدیم بهترین برهمکنش را از نظر تشکیل نانوکمپلکس در $\text{pH}=4/1$ داشته و با کم و زیاد شدن pH در این شرایط، میزان تمایل پکتین و کازئینات به یکدیگر به ترتیب کاهش و افزایش می‌یابد. اثر pH بر اندازه ذرات سیستم‌های متشکل از پلی‌ساکارید-پروتئین در پژوهش‌های دیگر محققان نیز ذکر شد. نتایج پژوهش‌های این محققان بیانگر این مطلب بود که با کاهش pH از ۷ به ۴، اندازه ذرات محلول پکتین کم‌استر-بتالاکتوگلوبولین تقریباً ثابت و در pH زیر ۴، افزایش شدیدی می‌یابد (۲۱). در این تحقیق، اندازه ذرات کمپلکس‌های پکتین پراستر-بتالاکتوگلوبولین نیز تقریباً در حدود ۳۰۰ نانومتر ثابت باقی ماند ولی اندازه ذرات کمپلکس‌های کاراگینان - بتالاکتوگلوبولین، در محدوده pH ۴/۷ تا ۷ یکباره کاهش یافت (۲۱). بطور کلی سیستم کاراگینان-بتالاکتوگلوبولین به تغییرات pH حساس‌تر و اندازه ذرات در تمام pH ها بزرگ‌تر از سیستم پکتین - بتالاکتوگلوبولین بود به طوری که در pH ۴/۷۵، اندازه ذرات سیستم پکتین-بتالاکتوگلوبولین حدود ۲۰۰ تا ۳۰۰ نانومتر و سیستم کاراگینان-بتالاکتوگلوبولین حدود ۷۰۰ نانومتر و مقادیر شاخص چند پخشی (PDI) برای سیستم کاراگینان بالاتر از سیستم‌های حاوی پکتین بود (۲۱). بررسی‌های انجام شده بر روی نانوکمپلکس کازئینات-صمغ عربی نیز نشان داد که در نسبت ۰/۱ به ۰/۱ دو بیوپلیمر و در pH بین ۵/۴ و ۴/۲، اندازه ذرات در حدود ۱۱۵ نانومتر ثابت باقی می‌ماند و خارج از این محدوده pH ، افزایش می‌یابد (۲۲).

کدورت: اندازه، غلظت و ضریب شکست نسبی ذرات از جمله عوامل مؤثر بر میزان کدورت سوسپانسیون هستند و افزایش این پارامترها می‌تواند موجب افزایش در کدورت شود. نتایج به دست آمده نشان داد که کمپلکس حاوی امگا ۳، نسبت به کمپلکس بدون امگا ۳ دارای کدورت بیشتری است. افزایش در میزان کدورت را می‌توان به افزایش در اندازه ذرات کمپلکس با ورود امگا ۳ در آن (مطابقت با نتایج مربوط به اندازه ذرات)، وجود قطرات امگا ۳ آزاد در محیط آبی، تغییر در ضریب شکست نور تابیده شده و پراکنده کردن آن و وجود حلال آلی استون و اتانول در فاز آبی و افزایش ضریب شکست آن نسبت داد.

طیف‌سنجی فروسرخ (FT-IR): از آنجا که گروه‌های عاملی مختلف، دارای جذب در فرکانس‌های مشخصی هستند و تغییر در ساختار مواد سبب تغییر در فرکانس‌های جذبی می‌شود؛ بنابراین اسپکتروسکوپی IR به عنوان وسیله‌ای مناسب در تشخیص و نمایش تغییرات ساختاری در مواد معرفی می‌شود. با توجه به شکل (۱) و مقایسه طیف‌های a و

علاوه بر کارئینات با پکتین نیز پیوند متیل استری برقرار کرده است.

گرماسنجی اسکنی افتراقی (DSC): نتایج DSC، حذف پیک‌های مربوط به پکتین و کارئینات خالص و تشکیل پیک جدید در دمای بالاتر ($248/7^{\circ}\text{C}$) را در اثر اختلاط محلول-های ۱٪ کارئینات سدیم و ۰/۴۵٪ پکتین در $\text{pH}=4/1$ نشان داد (شکل ۲-d). جابه‌جایی پیک ذوب و هم‌چنین عدم حضور دو پیک مربوط به ترکیبات اولیه کارئینات و پکتین نشان‌دهنده ایجاد پیوند و تشکیل ماده جدیدی است که خواص آن با ترکیبات سازنده اولیه متفاوت است. این نتیجه با مشاهدات طیف‌سنجی IR مبنی بر ایجاد برهمکنش جاذبه الکتروستاتیک بین COO^- -پکتین و NH_3^+ -کارئینات مطابقت دارد. افزایش نقطه ذوب، تشکیل ساختارهای منظم و متراکم‌تر را در اثر ایجاد برهمکنش الکتروستاتیک و تشکیل کمپلکس بین پکتین-کارئینات را نشان داد (شکل ۲). *Honary* و همکاران، با بررسی خواص حرارتی میکروذرات کیتوزان-آلژینات، جابه‌جایی پیک ذوب را به ایجاد پیوندهای الکتروستاتیک بین گروه کربوکسیل آلژینات و آمین کیتوزان و تشکیل کمپلکس بین این دو ترکیب نسبت دادند (۱۷). *Zaleska* و همکاران نیز طی تحقیق بر خواص حرارتی کمپلکس نشاسته سیب زمینی-پروتئین ایزوله آب پنیر، جابه‌جایی پیک اندوترمیک نمونه کمپلکس، نسبت به مواد خام اولیه و قرار گرفتن آن در بین پیک‌های اندوترمیک نشاسته و پروتئین را به دلیل برقراری کمپلکس و تشکیل ساختار جدید گزارش کردند (۲۷). با توجه به اینکه در کمپلکس کارئینات-پکتین-امگا ۳ تنها یک پیک ذوب وجود دارد و پیک مربوط به ذوب امگا ۳ در آن دیده نمی‌شود؛ می‌توان گفت که امگا ۳ به صورت آزاد وجود ندارد و احتمالاً وارد برهمکنش‌های الکتروستاتیک و یا آبریز با ترکیبات بیوپلیمری شده و خواص حرارتی آن تغییر کرده است. این نتایج نیز با مشاهدات طیف‌سنجی IR در این تحقیق مطابقت دارد. افزایش دمای ذوب نمونه‌های کمپلکس حاوی امگا ۳ را می‌توان به تشکیل نواحی بلوری کامل‌تر نسبت به نمونه‌های بدون امگا ۳ نسبت داد (شکل ۲). با توجه به شکل (۲) بالاترین نقطه ذوب، برای نمونه کارئینات-امگا ۳ (بدون پکتین) مشاهده شد و پیک اندوترمیک دوم در این ترکیب، احتمالاً به تخریب شدن ترکیب کارئینات-امگا ۳ در دماهای بالا مربوط می‌شود. کاهش دمای انتقال شیشه‌ای در نمونه‌های کمپلکس (حاوی امگا ۳ و بدون آن) احتمالاً به دلیل کاهش وزن مولکولی نمونه کمپلکس نسبت

نتایج حاصل از طیف‌سنجی IR نمونه‌های حاوی امگا ۳، هیچ یک از اعداد موج مربوط به امگا ۳ خالص (گزارش شده در جدول ۲) را نشان نداد و می‌توان گفت که امگا ۳ در سطح کارئینات و به صورت آزاد وجود ندارد بلکه توسط کارئینات پوشیده شده است. از سوی دیگر، با توجه به اینکه پیک‌های مربوط به عدد موج‌های (cm^{-1}) ۳۳۲۱، ۳۰۶۲، ۲۹۶۸ و ۱۵۲۲ در کارئینات، به ترتیب به (cm^{-1}) ۳۲۹۵، ۳۰۶۷، ۲۹۵۳ و ۱۵۵۹ در کارئینات-امگا ۳ انتقال یافته‌اند، می‌توان نتیجه گرفت که بین کارئینات و امگا ۳ برهمکنش اتفاق افتاده است و ساختار جدیدی شکل گرفته است و با توجه به وجود بخش‌های آبریز در ساختار کارئینات، این برهمکنش‌ها احتمالاً از نوع برهمکنش‌های آبریز می‌باشند. انحراف شدید در عدد موج 3321cm^{-1} نمودار a، احتمالاً به دلیل وجود ترکیبات بلند زنجیر امگا ۳ می‌باشد. به طور کلی، موقعیت ارتعاشات کششی C-H متصل به باندهای دوگانه سیس $\text{C}=\text{C}$ - در محدوده عدد موج 3100cm^{-1} - 3000 بسته به بلندی زنجیر و تعداد باند دوگانه در زنجیر اسید چرب، منحرف می‌شود و هر چه تعداد باندهای دوگانه یا بلندی زنجیر بیشتر باشد ($C > 14$)، میزان این انحراف شدیدتر است (۲۶).

شکل (d-۱)، ترکیب کمپلکس بین بیوپلیمرها به همراه امگا ۳ را نشان می‌دهد و همانند نمودار a جابه‌جایی پیک‌ها، ایجاد برهمکنش‌های آبریز بین امگا ۳ و کارئینات را به اثبات می‌رساند. علاوه بر این، گروه عاملی آنیدرید در نمودار، در عدد موج 1783cm^{-1} مشاهده شد که احتمالاً به دلیل ایجاد برهمکنش بین گروه‌های اسیدی امگا ۳ و گروه کربوکسیلیک اسید پکتین می‌باشد.

کاهش جذب در عدد موج 1653cm^{-1} (پیوندهای دوگانه سیس $\text{C}=\text{C}$ -) شکل (e-۱) و 3300cm^{-1} - 3100cm^{-1} (گروه-های عاملی C-H متصل به $\text{C}=\text{C}$ -) نشان‌دهنده کاهش تعداد باندهای دوگانه در ترکیب امگا ۳ و به عبارت دیگر اشباع شدن باندها می‌باشد و با توجه به نتایج حاصل از طیف‌سنجی IR می‌توان نتیجه گرفت که امگا ۳ در اثر عمل پاستوریزاسیون اکسید شده است. این امر احتمالاً به دلیل دناتور شدن پروتئین در اثر فرایند حرارتی و در نتیجه افزایش تداخل و پرزهای کپسول حاصله، نشأت ترکیبات امگا ۳ به بیرون کپسول و در نتیجه اکسید شدن آن می‌باشد. با توجه به طیف‌های a، d و e مشاهده می‌شود که میزان جذب IR در عدد موج 1743cm^{-1} ، در نمودار a کم، و با افزودن پکتین به ترکیب این مقدار زیادتر شده است (نمودارهای d و e). با افزودن پکتین، احتمالاً گروه‌های متیل با گروه COO^- تشکیل پیوند استری داده است و می‌توان گفت که امگا ۳

(۷). در پژوهشی دیگر *Ron* و همکاران نیز مناسب بودن بتالاکتوگلوبولین را برای به دام انداختن ویتامین D₂ (ترکیب آبگریز) تأیید کردند و نشان دادند که تمایل این ویتامین برای قرار گرفتن در بخش‌های آبگریز بتالاکتوگلوبولین - پکتین، ۷۷/۲۶ mg/ml می‌باشد (۱۳). *Luo* و همکاران، طی پژوهشی نشان دادند که با افزایش غلظت زئین-کیتوزان حاوی آلفاتوکوفرول، درصد کپسولاسیون از ۷۶/۵٪ به ۸۶/۵٪ افزایش می‌یابد که با نتایج به دست آمده از این تحقیق مطابقت دارد (۱۲). *Harris* و همکاران، نانوذرات کیتوزان - تری پلی فسفات پنتا سدیم را به عنوان ترکیبی مناسب برای کپسولاسیون ترکیبات فنلی با کارایی کپسولاسیون ۸۸٪ معرفی کردند (۲۸).

نتیجه گیری: مقادیر pH و غلظت بیوپلیمرهای مورد استفاده در تولید حامل‌های کمپلکس، اثرات قطعی در ویژگی‌های کاربردی این سیستم‌ها داراست به همین دلیل در طراحی این سیستم‌ها برای نوشیدنی‌های مختلف باید مقادیر بهینه این دو عامل را در نظر گرفت. در این تحقیق در ۴/۱ PH کوچکترین ذرات تولید شد و بطور کلی با افزایش غلظت کازئینات مقدار پکتین مورد نیاز نیز برای کاهش اندازه ذرات افزایش می‌یابد. حضور پکتین نه تنها با افزایش دافعه الکترواستاتیک اطراف ذرات کازئینی موجب افزایش پایداری و کاهش اندازه ذرات می‌گردد بلکه با جلوگیری از توده شدن موجب افزایش کارایی انکپسولاسیون امگا ۳ نیز می‌شود.

به مواد اولیه و یا اثر نرم کنندگی اسیدهای چرب بر کمپلکس بیوپلیمری می‌باشد.

کارایی کپسولاسیون: نتایج حاصل از کروماتوگرافی گازی برای کلیه فرمولاسیون‌های تولید شده کارایی بالای ۱۲٪ و مناسب بودن کازئینات سدیم (به دلیل داشتن بخش‌های آبگریز در ساختار) برای انکپسولاسیون امگا ۳ را نشان داد. همان طور که از نتایج جدول (۴) برمی‌آید، افزایش غلظت کازئینات سدیم، کارایی کپسولاسیون را افزایش داد. افزایش درصد امگا ۳ موجود در نمونه ۲ به دلیل افزایش بخش‌های آبگریز کازئینات سدیم، با افزایش غلظت کازئینات سدیم و هم‌چنین پایداری این ترکیب در برابر توده‌ای شدن اسیدی می‌باشد، زیرا همان طور که گفته شد، کمپلکس حاوی ۱٪ کازئینات سدیم و پکتین ۰/۴۵٪ بیشترین پایداری را در برابر توده‌ای شدن و افزایش اندازه ذرات داشتند. با توجه به درصد بالای کپسولاسیون در نمونه ۲، می‌توان نتیجه گرفت که pH اسیدی (۴/۱) نه تنها اثر منفی در تخریب امگا ۳ نداشته است بلکه، با کاهش دافعه الکترواستاتیکی آن در اثر یونیزاسیون و افزایش خاصیت آبگریزی امگا ۳، کارایی کپسولاسیون را افزایش داده است (۷). *Zimet* و همکاران، با بررسی کارایی کپسولاسیون کمپلکس بتالاکتوگلوبولین - پکتین حاوی DHA، این میزان را ۶۴٪ مقدار DHA افزوده شده در نانوکپسول‌ها گزارش کردند و بتالاکتوگلوبولین را به دلیل داشتن بخش‌های آبگریز در ساختار خود به عنوان پروتئینی مناسب برای انتقال ترکیبات آبگریز معرفی کردند

• References

1. Considine T, Patel HA, Singh H, Creamer LK. Influence of binding conjugated linoleic acid and myristic acid on the heat- and high-pressure-induced unfolding and aggregation of [beta]-lactoglobulin B. *Food Chem* 2007;102:1270-80.
2. Lavie CJ, Milani RV, Mehra MR, Ventura HO. Omega-3 Polyunsaturated fatty acids and cardiovascular diseases. *J Am Coll Cardiol* 2009;54:585-94.
3. Freemantle E, Vandal M, Tremblay-Mercier J, Tremblay S, Blachère JC, Bégin ME, et al. Omega-3 fatty acids, energy substrates, and brain function during aging. *Prostag Leukotr ESS* 2006;75:213-20.
4. Lopez-Huertas E. Health effects of oleic acid and long chain omega-3 fatty acids (EPA and DHA) enriched milks, A review of intervention studies. *Pharmacol Res* 2010;61:200-207.
5. Liu Z, Jiao Y, Wang Y, Zhou C, Zhang Z. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Adv Drug Deliver Rev* 2008;60:1650-62.
6. Ye, A, Flanagan J, Singh H. Formation of stable nanoparticles via electrostatic complexation between sodium caseinate and gum. *Arabic Biopolymers* 2006;82:121-33.
7. Zimet P, Livney YD. Beta-lactoglobulin and its nanocomplexes with pectin as vehicles for omega 3 polyunsaturated fatty acids. *Food Hydrocoll* 2009;23:1120-26.
8. Nussinovitch A. Hydrocolloid application gum thecnology in the food and other industries. Blackie academic and professional. London; 1997. p. 247-264.
9. Philips GO, Williams PA. *HandBook of hydrocolloids*. CRC press. Florida; 2000. p. 443.
10. Chen L, Remondetto GE, Subirade M. Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. *Trends Food Sci Tech* 2006;17:272-83.
11. Girard M, Turgeon SL, Gauthier SF. Thermodynamic parameters of beta-lactoglobulin -

- pectin complexes assessed by isothermal titration calorimetry. *J Agr Food Chem* 2003;51:4450–55.
12. Luo Y, Zhang B, Whent MYUL, Wang Q. Preparation and characterization of zein/chitosan complex for encapsulation of tocopherol, and its in vitro controlled release study. *Colloid Surface B* 2011;85:145–52.
 13. Ron N, Zimet P, Livney YD. Beta-lactoglobulin-polysaccharide complexes as nanovehicles for hydrophobic nutraceuticals in non-fat foods and clear beverages. *Int Dairy J* 2010;20:686-93.
 14. Ye A. Complexation between milk proteins and polysaccharides via electrostatic interaction: principles and applications – a review. *Int J Food Sci Tech* 2008;43:406–15.
 15. Bedie GK, Turgeon SL, Makhlof K. Formation of native whey protein isolate–low methoxyl pectin complexes as a matrix for hydro-soluble food ingredient entrapment in acidic foods. *Food Hydrocoll* 2008;22:836–44.
 16. Semo E, Kesselman E, Danino D, Livney YD. Casein micelle as a natural nano-capsular vehicle for nutraceuticals. *Food Hydrocoll* 2007;21:936–42.
 17. Honary S, Maleki M, Karimi M. The effect of chitosan molecular weight on the properties of alginate/chitosan microparticles containing prednisolone. *Trop J Pharma Res* 2009;8:53-61.
 18. Maroziane A, de Kruif CG. Interaction of pectin and casein micelles. *Food Hydrocoll* 2000;14:391–94.
 19. Pereyra RS, Schmidt KA, Wicker L. Interaction and stabilization of acidified casein dispersions with low and high methoxyl pectins. *J Agr Food Chem* 1997;45:3448–51.
 20. Kouame FA, Bohoua G, Assemmand EF, Tano K, Kouame PL. Effect of low methoxylpectin in acidified milk gels 2010; 8(2); 46-51.
 21. Tuinier R, Rolin C, de Kruif CG. Electrosorption of pectin onto casein micelles. *Biomacromolecules* 2002 3:632– 638.
 22. Jones W, Decker EA, McClements DJ. Thermal analysis of beta-lactoglobulin complexes with pectins or carrageenan for production of stable biopolymer particles. *Food Hydrocoll* 2010;24:239–48.
 23. Grenha A, Gomes ME, Rodrigues M, Santo VE, Mano JF, Neves NM, Reis RL. Development of new chitosan/carrageenan nanoparticles for drug delivery applications *J Biomed Mater Res* 2010; 92(4):1265-72.
 24. Grenha A, Gomes ME, Rodrigues M, Santo VE, Mano JF, Neves NM, et al. Development of new chitosan/carageenan nanoparticles for drug delivery applications. *J Mater Res A* 2009;92:1265-72.
 25. Li P, Dai YN, Zhang JP, Wang AQ. Chitosan-Alginate nanoparticles as a novel drug delivery system for nifedipine. *Int J Biomed Sci* 2008;4:221-28.
 26. Dudhani AR, Kosaraju SL. Bioadhesive chitosan nanoparticles: Preparation and characterization. *Carbohydr Polym* 2010;81:243-51.
 27. Yoshida S, Yoshida H. Nondestructive analyses of unsaturated fatty acid species in dietary oils by attenuated total reflectance with Fourier transform IR spectroscopy. *Biopolymers* 2003;70:604-13.
 28. Zaleska H, Ring S, Tomasik P. Electrosynthesis of potato starch-whey protein isolate complexes. *Carbohydr Polym* 2001;45:89-94.
 29. Harris R, Lecumberri E, Mateos-Aparicio I, Mengibar M, Heras A. Chitosan nanoparticles and microspheres for the encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. *Carbohydr Polym* 2011;84:803–806.

Nanoencapsulation of omega-3 fatty acids using caseinate-pectin based complexes: FTIR, DSC, particle size, and encapsulation efficiency

Bahrani S¹, Ghanbarzadeh B², Hamishekar H^{3}, Sowti khiyabani M⁴*

1- M.Sc Student in Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

2- Associated Prof, Dept. of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

*3- *Corresponding author: Assistant Prof, Dept. of Pharmaceutical Sciences, Pharmaceutical Technology Laboratory, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran, E-mail: hamishekar.hamed@gmail.com*

4- Assistant Prof, Dept. of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Received 17 Apr, 2013

Accepted 16 Jul, 2013

Background and Objectives: A protein-polysaccharide complex can be used to produce nanocapsules containing nutrients and active compounds. This study determined optimum conditions for producing caseinate-pectin based nanocomplexes containing omega-3 fatty acids with minimal particle size and size distribution and evaluated the stability and encapsulation efficiency of this system.

Materials and Methods: Caseinate-pectin nanocapsules were formed by the addition of electrolyte salts into the caseinate solution (0.5%, 1%, 1.5%) containing omega-3 and pectin solution (0.2%, 0.45%, 0.7%) into the system. The pH was then adjusted to below the isoelectric point of the protein. Determination of the size and size distribution was done using the laser light scattering method. Infrared spectroscopy (FTIR) and differential scanning calorimetry (DSC) were used to detect complex formations and the types of interaction between the biopolymers and omega-3 and the thermal behavior of the complexes. Gas chromatography (GC) was used to determine the encapsulation of omega-3. A three-level four-factorial Box-Behnken experimental design was employed using Minitab 15 software to analyze particle size.

Results: The complex containing 1% sodium caseinate and 0.45% pectin at pH = 4.1 had a the smallest particle size (86 nm) and turbidity; with omega-3 capsulation, the particle size increased to 118 nm. FTIR results showed complex formation and interaction (electrostatic and hydrophobic) between the biopolymers and omega-3 and DSC results showed formation of new structures. Gas chromatography results showed an encapsulation efficiency of 12%-76% for the different formulations.

Conclusions: The results showed that pH, pectin, and caseinate biopolymer concentrations played important roles on the particle size of the complex, stability, and encapsulation efficiency. This system can be used to encapsulate omega-3 in beverages having relatively acidic pH values.

Keywords: Caseinate-pectin nanocomplex, Omega-3, DSC, FTIR, Encapsulation efficiency