

بررسی میان کنش‌های الکترواستاتیک بتالاکتوگلوبولین و تراگاکانتین:

گام نخست به سوی تولید میکرو و نانو ذرات بیوپلیمری

مهتاب حسن‌دخت فیروز^۱، پریوش هراتیان^۲، رزیتا کمیلی فنود^۳، محمد امین محمدی فر^۴

- ۱- دانشآموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، انتستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
- ۲- مری گروه آموزشی علوم و صنایع غذایی، انتستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
- ۳- کارشناس گروه تحقیقات صنایع غذایی، انتستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
- ۴- نویسنده مسئول: دانشیار گروه آموزشی علوم و صنایع غذایی، انتستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی. پست الکترونیکی: mohamdif@ut.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۹۱/۶/۱۸

تاریخ دریافت: ۹۱/۳/۱۶

چکیده

سابقه و هدف: بررسی رفتار کلوفیدی سامانه‌های پروتئین-پلی‌ساقارید، اهمیت روزافروزی برای فراهم‌آوری پایه‌ای مناسب در راستای دستیابی به کاربردهای مختلف آن‌ها (مانند تولید میکرو و نانو ذرات بیوپلیمری، طراحی آنالوگ‌های غذایی و فناوری ریزپوشینه کردن) پیدا کرده است. هدف این پژوهش، بررسی گذارهای کلیدی ناشی از تغییر pH در جریان جدایش فازی تجمعی بتالاکتوگلوبولین و تراگاکانتین بود.

مواد و روش‌ها: تشکیل کمپلکس‌های الکترواستاتیک در پراکنش‌های حاوی مخلوط بتالاکتوگلوبولین و تراگاکانتین (غلضت کل پلیمر ۰/۳ درصد وزنی و نسبت پروتئین به پلی‌ساقارید ۲ به ۱) تابع pH (۲-۶) با استفاده از طیفسنجی و آنالیز اندازه ذرات بررسی شد. از رئومتری به موازات اسیدی کردن آرام پراکنش مخلوط، با گلوكونولاتالاكتون، برای پایش گذارهای ساختاری سامانه استفاده شد. اثر نوع و غلظت نمک روی تشکیل میکروذرات حاصل تعیین شد.

یافته‌ها: تشکیل کمپلکس‌های محلول در pH=۵/۲۰ آغاز شد، در pH=۴/۸۵ کمپلکس‌های درون پلیمری رخ داد و به انجام جدایش فازی در pH=۴/۳۰ منتهی شد. پارامترهای ثبت شده نشان داد که توده‌ای شدن مرکب در pH=۴/۱۵ رخ می‌دهد. در نهایت، مخلوط به حالت یک سامانه‌ی تک فازی در pH=۲/۵۰ بازگشت. آنالیز اندازه ذرات نشان داد که ساختارهای مرکب نوعی فرایند جمع و فشرده شدن را در جریان کمپلکس شدن تجربه می‌کنند. رئومتری دریافت‌های عمیق‌تری از رفتار کلوفیدی سامانه را فراهم آورد و نتایج در توافق با گذارهای ناشی از pH، تعیین شده با تیتراسیون با HCl بود. تشکیل میکروذرات به شدت وابسته به نمک بود.

نتیجه‌گیری: تحت شرایط کنترل شده pH، میان کنش‌های الکترواستاتیک بتالاکتوگلوبولین و تراگاکانتین می‌تواند برای تشکیل گونه‌های مختلف ذرات بیوپلیمری به کار گرفته شود. این میکرو و نانو ذرات حاصل می‌توانند در صنعت غذا به عنوان سامانه‌های تحويل دهنده‌ی طبیعی یا جایگزین چربی به کار روند.

واژگان کلیدی: بتالاکتوگلوبولین، تراگاکانتین، میان کنش‌های پروتئین-پلی‌ساقارید، جدایش فازی تجمعی، میکروذرات بیوپلیمری

• مقدمه

از سامانه‌های غذایی حضور دارند و میان کنش این دو پلیمر نقش مهمی در ساختار و پایداری مواد غذایی دارد (۴). کنترل و مدیریت این میان کنش می‌تواند به عنوان یک عامل کلیدی در توسعه فراورده‌ها و فرایندهای نوین صنعت غذا

طی دو دهه اخیر، انگیزش چشمگیری در راستای طراحی و بهینه‌سازی سامانه‌های چندفازی با میان کنش درشت ملکول‌های طبیعی پدیدار شده است (۳). پروتئین‌ها و پلی‌ساقاریدها اغلب در کنار یکدیگر در بسیاری

بنا لاكتوگلوبولین که حدود ۵۰٪ پروتئین‌های آب پنیر را تشکیل می‌دهد، پروتئینی کوچک و کروی، با وزن ملکولی ۱۸۳۵۰ دالتون است (۱۰). این پروتئین در ترکیب فرمولاسیون‌های غذای کودک و غذاهای رژیمی به دلیل ارزش تغذیه‌ای بالا و نیز به عنوان یک عامل ساختاردهنده‌ی اولیه، استفاده می‌شود (۱۱). شایان ذکر است، این پلیمر طبیعی را می‌توان از آب پنیر بازیافت کرد که شامل بخش عمده‌ای از ضایعات صنایع لبنی می‌شود.

صمغ کتیرا که یک پلی‌ساقارید منشعب و هتروزن است، تراوه‌ی خشک شده‌ی طبیعی حاصل از برخی گونه-های آستراگالوس است و از سال ۱۹۹۶ در فهرست GRAS (Generally Recognized As Safe) قرار گرفته است. از سوی کمیته متخصصان افزودنی‌های مواد غذایی WHO/FAO (Joint WHO/FAO Expert Committee on Food Additives) تحت عنوان بالاترین رده ارزیابی امنیت غذایی (ADI not Specified) هیدروکلورید که پایداری اسیدی آن بسیار بالاست، به عنوان یک عامل سوسپانسیون کننده، پایدارکننده، امولسیون‌کننده و قوام دهنده در صنایع دارویی، آرایشی و به ویژه صنایع غذایی کاربرد دارد. صوغ کتیرا از دو جزء اصلی تشکیل شده است: تراگاکانتین (جزء محلول در آب) و باسورین (جزء متورم شونده در آب) (۱۲). با استفاده از کروماتوگرافی طرد اندازه (Size exclusion) و دکستران به عنوان استاندارد، وزن ملکولی جزء محلول صوغ کتیرای ایرانی در حدود 3×10^6 تعیین شده است (۱۳). در پژوهشی دیگر، وزن ملکولی تراگاکانتین در محدوده $10^5 \times 10^6$ تا $10^6 \times 10^7$ گزارش شده است (۱۴). اخیراً، پژوهش‌های انجام شده در زمینه‌ی اثر افزودن صوغ کتیرا بر دوغ پیشنهاد کرده‌اند که میان‌کنش‌های الکترواستاتیک پروتئین‌های شیری با جزء محلول صوغ در سازوکار پایدارسازی این نوشیدنی نقش کلیدی دارد (۱۵، ۱۶).

استفاده بهینه از میان‌کنش‌های پروتئین‌ها و پلی-ساقاریدها برای توسعه فراورده‌ها و فرایندهای نوین صنعت غذا، منوط به داشتن داده‌های بنیادی است. از این رو، طی دهه اخیر، بررسی رفتار کلوزیدی سامانه‌های پروتئین-پلی‌ساقارید یکی از پرکارترین حوزه‌های پژوهش‌های پایه‌ای در صنعت غذا بوده است (۱۷، ۱۸، ۱۹).

پژوهش حاضر به تحقیق و توصیف پدیده‌ی توده‌ای شدن مرکب میان بتالاکتوگلوبولین و صوغ کتیرای تراویده از

باشد. زیرا میان‌کنش پیش گفته، ویژگی‌های عملکردی پروتئین‌های غذایی از جمله ویژگی‌های مربوط به جذب آب (حلالیت و ویسکوزیته)، ویژگی‌های ساختاری (هم انبوهی Aggregation و تشکیل ژل) و خصوصیات سطحی (قابلیت امولسیفایری و تشکیل کف) را به شدت تحت تأثیر قرار می‌دهد (۵).

پراکنش‌های (Dispersions) رقيق این دو پلیمر طبیعی، در نتیجه‌ی بالا بودن انرژی آزاد اختلاط سامانه اغلب ناپایدار است و دچار جدا شدن فازی می‌شود (۴). هنگامی که برآیند میان‌کنش دو نوع پلیمر که عمدتاً الکترواستاتیک است، از نوع جاذبه باشد، ابتدا کمپلکس‌های محلول درون پلیمری (Intrapolymeric complexes) فرایند و کاهش H₊ کمپلکس‌های میان پلیمری (Interpolymeric complexes) و در نهایت با گذشت زمان فازی کسانتره و غنی از دو پلیمر (فاز کواسرویت یا توده شده Coacervate phase) تشکیل می‌شود. فاز دیگر عمدتاً شامل حلال خواهد بود. این پدیده که از آن تحت عنوان جدایش فازی تجمعی (Associative phase separation) یا توده‌ای شدن مرکب (Complex coacervation) یاد می‌شود، نوعی جدایش فازی به صورت مایع/مایع است (۶، ۷) و تحت سازوکار هسته‌زایی و رشد انجام می‌شود (۹، ۸). شایان ذکر است این پدیده و خصوصیات فیزیکی شیمیایی کمپلکس‌های حاصل از آن بسیار متأثر از عوامل درونی سامانه است، مانند: pH، قدرت یونی، نسبت پروتئین به پلی‌ساقارید، غلظت کل پلیمر در سامانه و موارد دیگر. عوامل فرایند (حرارت و فشار) نیز تأثیرگذار هستند (۵).

پدیده توده‌ای شدن مرکب، موضوع مورد توجه برای تحقیقات بنیادی به ویژه در ک سازوکار فرایندهای زیستی در حیطه بیولوژی و نانوبیوتکنولوژی است. از دیدگاه کارکردی، استفاده از این پدیده در زمینه‌های مختلف بسیار رو به رشد بوده است، مانند: خالص‌سازی پلیمرها (با کارایی بیشتر و ارزان‌تر در مقایسه با روش‌های متداولی مانند کروماتوگرافی)، فرمولاسیون‌های غذایی (جایگزین چربی، گوشت و عامل بافت‌دهنده)، ساخت مواد زیستی (پوشش‌های خوراکی، پیوند اعضای مصنوعی)، ریزپوشینه کردن مواد غذایی و دارویی (انواع ریز مغذی‌ها و مواد مولد طعم) و تولید میکرو و نانوذرات بیopolymerی (۵، ۲).

آماده‌سازی پراکنش مخلوط بتالاکتوگلوبولین و تراگاکانتین: پراکنش‌های مخلوط بتالاکتوگلوبولین و تراگاکانتین با افزودن مقادیر مشخص از محلول بتالاکتوگلوبولین به محلول تراگاکانتین به دست آمدند به گونه‌ای که غلضت کل پلیمر و نسبت پروتئین به پلی‌اساکارید به ترتیب $0/3$ درصد وزنی و 2 به 1 بود. نمونه‌ها با به کارگیری اسید کلریدریک $0/01$ و $0/01$ نرمال (و در صورت نیاز سود $1/00$ و $1/01$ نرمال) از $pH=2-7$ اسیدی شدند. پس از تنظیم pH مخلوط در میزان مورد نظر، نمونه‌ای برای انجام آزمون‌های طیف‌سنجدی نوری و نمونه‌ی دیگری برای اندازه‌گیری توزیع اندازه ذرات برداشت شدند. برای انجام آزمون‌های رئولوژیک، پراکنش مخلوط با pH اولیه 7 با به کارگیری گلوکونوکلات‌تون به آرامی اسیدی شد. برای پوشش محدوده مورد نظر ($pH=3/8-7$) در حدود $14/0$ درصد وزنی گلوکونوکلات‌تون به مخلوط اضافه شد. سپس، به منظور حل شدن یکنواخت آن، مخلوط تحت همزدن آرام در دمای $10^{\circ}C$ در $22 \pm 0/10$ قرار گرفت. پس از آن، نمونه‌ای برای انجام آزمون‌های رئولوژیک برداشت شد و به طور موازی نمونه‌ای دیگر برای پایش pH تابع زمان، درون انکوباتور (فن آرما گستر، CMS5، ایران) قرار گرفت. لازم به ذکر است برای بررسی اثر نمک بر میزان میان‌کنش در pH بهینه، غلظت نمک خارجی موجود در سامانه بر حسب طراحی آزمون، با استفاده از کلرید سدیم یا کلرید کلسیم در پنج سطح $2, 4, 8, 16$ و 32 میلی‌مولار تنظیم شد. نمونه‌های شاهد (حاوی بتالاکتوگلوبولین یا تراگاکانتین) تحت شرایط مشابه با پراکنش مخلوط برای هر آزمون آماده شدند.

آزمون‌های طیف‌سنجدی: میزان جذب سامانه مدل با استفاده از دستگاه طیف‌سنجدی مرئی-ماورای بنسن (SP-300 PLUS Optima، ژاپن) در طول موج 635 نانومتر (مشابه با طول موج نور لیزر به کار رفته برای آزمون‌های اندازه‌گیری اندازه ذرات) در دمای $22^{\circ}C$ 20 دقیقه پایش شد (هر 20 ثانیه).

اندازه‌گیری توزیع اندازه‌ی ذرات: پایش پارامترهای توصیف کننده اندازه‌ی ذرات موجود در سامانه، بر اساس

گون گونه آسترالگالوس فلوکوسوس در یک سامانه‌ی مدل می‌پردازد. با به کارگیری سه تکنیک تکمیل‌کننده (طیف‌سنجدی نور مرئی، تفرق نور لیزر و رئولوژی) رفتار کلوبیدی سامانه و تشکیل گونه‌های مختلف ذرات بیوپلیمری با تعیین pH ‌های کلیدی (که میان گذارهای بحرانی سامانه در جریان میان‌کنش هستند) پایش می‌شود. با توجه به این که 70% صفحه تراویده از این گونه را جزء محلول تشکیل می‌دهد (۱۸) و استفاده از سامانه‌های همگن‌تر امکان دستیابی به داده‌های بنیادی را تسهیل می‌کند، طراحی آزمون‌ها بر پایه‌ی جزء محلول صفحه انجام شد. همچنین، اثر نمک‌های کلرید سدیم و کلرید کلسیم بر تشکیل میکروذرات حاصل در pH بهینه میان‌کنش بررسی شد.

• مواد و روش‌ها

مواد: پودر بتالاکتوگلوبولین با درجه‌ی HPLC و خلوص بالای 90% (Sigma Aldrich Chemichal Co.)، آمریکا) خریداری شد و بدون خالص‌سازی بیشتر مورد استفاده قرار گرفت. نمونه‌های کتیرای تراویده از گون گونه آسترالگالوس فلوکوسوس به کمک کارشناسان/داره کل منابع طبیعی استان سمنان جمع‌آوری شد. نمونه‌ها با استفاده از آسیاب، پودر شده و با به کارگیری الکهای با مشاهده مختلف، پودرهای بین 200 تا 500 میکرون به دست آمد. برای آماده سازی جزء محلول صفحه، ابتدا پراکنش 1 درصد وزنی آن، در نتیجه حل کردن پودر صفحه در آب دیونیزه با استفاده از همزن مگنتدار به مدت 2 ساعت و آب‌گیری کامل آن در دمای یخچالی به مدت 18 ساعت تهیه شد. پس از آن، پراکنش حاصل در $g/10000$ به مدت 1 ساعت، در دمای $35^{\circ}C$ سانتریفیوژ شد و فاز رویی منجمد و سپس با استفاده از دستگاه خشک کن انجام‌دادی خشک شد. نمونه‌های حاصل در دسیکاتور برای آزمون‌های بعدی نگهداری شد. سایر مواد شیمیایی از شرکت Merck آلمان خریداری شدند.

آماده‌سازی محلول مادر بتالاکتوگلوبولین و تراگاکانتین: محلول‌های مادر بتالاکتوگلوبولین و تراگاکانتین با پراکنش مقادیر مشخص پودر آن‌ها در آب دیونیزه تحت هم زدن آرام، به مدت 2 ساعت در دمای محیط تهیه شدند. سپس برای اطمینان از آب‌گیری کامل پلیمرها به مدت 18 ساعت در دمای یخچالی نگهداری شدند. شایان ذکر است برای جلوگیری از رشد میکروبی $20/0$ درصد وزنی سدیم آزید به نمونه‌ها اضافه شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: تمامی آزمون‌ها با حداقل سه تکرار انجام شد. آنالیز آماری یافته‌ها بر حسب لزوم به روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) یا Independent-SPSS₁₄ با استفاده از نرم افزار SPSS₁₄ نتایج در قالب گزارش شده است. نتست دانکن در سطح احتمال ۵٪ برای تجزیه و تحلیل میانگین‌ها به کار رفت.

۰ یافته‌ها

طیف‌سنجدی نور مرئی: کدورت یک پراکنش تحت تأثیر مقدار، وزن ملکولی، اندازه، شکل و دیگر ویژگی‌های نوری ذرات موجود در پراکنش است. اندازه‌گیری کدورت متناظر با اسیدی کردن نمونه، به عنوان یک روش ساده و مینا، برای پایش فرایند توده‌ای شدن مرکب به طور گسترده استفاده شده است (۱، ۲). از این‌رو، در ابتدا رفتار کلوئیدی سامانه با استفاده از روش طیف‌سنجدی مورد بررسی قرار گرفت.

شکل ۱ پایش جذب سامانه‌های دوگانه و سه‌گانه‌ی مورد مطالعه را در pH=۶-۲ نشان می‌دهد. مقادیر جذب نمونه‌های شاهد (محتوی بتالاکتوگلوبولین یا تراگاکانتین) در کل محدوده pH، اندک و تقریباً ثابت بودند، درحالی که پروفایل جذب سامانه بتالاکتوگلوبولین و تراگاکانتین از الگوی مشخصی پیروی کرد. بر این اساس، یک طبیعت الکترواستاتیک غالب برای میانکنش این دو پلیمر استنباط می‌شود. مقادیر جذب پایین و ثابت بود تا این که pH سامانه به ۵/۲۰ کاهش یافت. افزایش ملایم جذب در این pH، بیانگر آغاز تشکیل کمپلکس‌های درون پلیمری است. پس از این گذار، از pH=۴/۸۵ مقادیر جذب به طور چشمگیری افزایش پیدا کرد که می‌تواند ناشی از همانبوهی ساختارهای تشکیل شده باشد. حداکثر مقدار جذب در pH=۴/۳۰ دیده شد، جایی که بیشترین تعداد ساختارهای تشکیل شده حضور دارند. شایان ذکر است در pH اخیر انجام جدایش فازی و یک ناپایداری ملایم در سامانه به طور ماکروسکوپیک قابل مشاهده بود. پس از آن متناظر با کاهش pH مقدار جذب کاهش پیدا کرد. سرانجام، در حوالی pH=۲/۵۰ مقدار جذب بسیار ناچیز شد و توده‌ای شدن مرکب به طور کامل بازداشت شد. این pH پایین‌تر از pK_a صمغ است.

Cilas particle size analyzer 1090 نئون (طول موج ۶۳۵ نانومتر) انجام شد. نتایج در قالب شاخص‌های $D_{0.9}$ ، $D_{0.5}$ ، $D_{0.1}$ و $D[4,3]$ گزارش شده است. ذرات موجود اند که قطری کمتر از مقدار داده شده دارند. $D[4,3]$ نوعی قطر معادل (میانگین حجمی قطر) ذرات است که مقدار آن از فرمول ۱ محاسبه می‌شود:

$$\text{فرمول ۱: } D[4,3] = \frac{\sum_{i=1}^n n_i d_i^4}{\sum_{i=1}^n n_i d_i^3}$$

آزمون‌های رئولوژیک: کلیه‌ی آزمون‌ها با استفاده از دستگاه رئومتر چرخشی Anton paar physica MCR 301، اتریش) انجام شد. رئومتری مورد استفاده، رئومتری استوانه‌ی هم محور (Concentric cylinder) با نسبت شعاعی ۱/۰۸۴۶ بود. برای تنظیم دمای سامانه از Peltier plate با حساسیت $\pm 0.01^\circ\text{C}$ مجهز به سیرکولاتور آب استفاده شد. برای جلوگیری از تبخیر حلal، نمونه‌ها در طول آزمایش با تله‌ی حلal (Solvent trap) پوشانده شدند. پایش ویسکوزیته‌ی سامانه تابع زمان در نرخ برش ثابت ۵ بر ثانیه و دمای ۲۲°C صورت گرفت. به طور موازی، پایش pH سامانه تابع زمان انجام شد. تشریح این روش در جای دیگری آورده شده است (۱۹).

تعیین pHهای کلیدی، مبین گذارهای بحرانی سامانه: مجموعه از pHهای کلیدی، مبین گذارهای بحرانی سامانه در جریان میانکنش دو پلیمر به صورت گرافیکی به عنوان نقطه‌ی تلاقی دو خط مماس بر منحی (محل تغییر شیب) در هر روش آزمون تعیین شد:

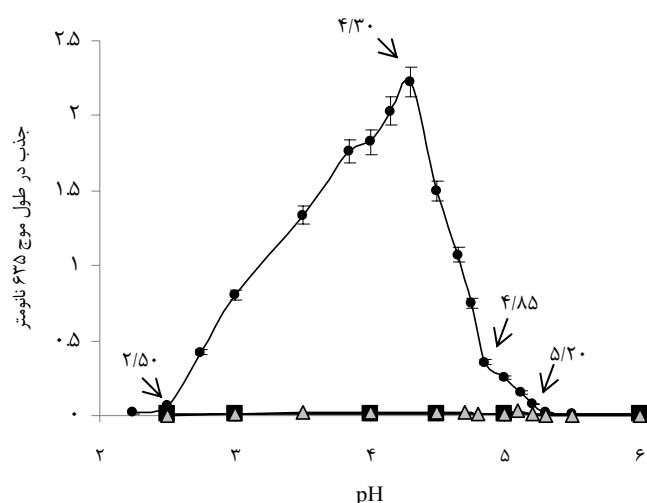
pH_{Soluble Complexes}: متناظر با تشکیل کمپلکس‌های محلول pH_{Complex Aggregation}: متناظر با همانبوهی کمپلکس‌های درون پلیمری و تشکیل کمپلکس‌های میان‌پلیمری pH_{Phase Separation}: متناظر با انجام جدایش فازی pH_{Coacervation}: متناظر با pH بهینه‌ی میانکنش (تشکیل کواسرویت‌ها)

pH_{Complex Suppression}: متناظر با بازداشت میانکنش

همان طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، سامانه‌ی به دست آمده در pH=۵/۰۰ کدورتی اندک و ثابت در طول زمان نشان می‌دهد که بیانگر پایداری کامل کمپلکس‌های محلول موجود در سامانه، در نتیجه‌ی مقداری بالای بار منفی آن‌ها است. در pH=۴/۵۰ مقداری جذب تابع زمان، تغییر معنی‌داری نداشتند که باز هم نشانی از پایداری سامانه در محدوده‌ی زمانی انتخابی است. به نظر می‌رسد که بار منفی باقی‌مانده‌ی روی کمپلکس‌ها از پیشرفت سریع همانبوهی بیشتر کمپلکس‌های بین پلیمری و در نتیجه، ناپایداری سامانه جلوگیری می‌کند. رفتار سینتیک سامانه در pH=۴/۳۰ حالتی حد واسط داشت. پس از یک دوره ثبات نسبی، مقداری جذب از ثانیه ۷۰۰ شروع به افزایش کرد؛ به طوری که در پایان آزمون مقدار جذب حدود ۲۰٪ افزایش یافته بود. توسعه‌ی تشکیل ساختارهای جدید و تنهشینی برخی از کمپلکس‌ها می‌تواند توجیه‌کننده‌ی این نکته باشد. هنگامی که pH به مقداری پایین‌تر کاهش پیدا کرد، پروفایل جذب به وضوح گذارهای قابل مشاهده‌ای را تابع زمان نشان داد. در pH=۴/۱۵ جذب طی ۱۲۰ ثانیه حدود ۳۹٪ افزایش پیدا کرد و به دنبال آن یک کاهش سریع و بسیار چشمگیر رخ داد؛ به طوری که طی ۲۸۰ ثانیه به ۹٪ مقدار اولیه خود رسید و پس از آن ثابت ماند. از نظر ماقروسکوپی، پراکنش محلوت به شدت ناپایدار بود و یک جدایش فازی بسیار سریع دیده شد. این سینتیک سریع پیشنهاد می‌کند که بار کمپلکس‌ها نزدیک به حالت خنثی بوده است. در pH=۳/۰۰ پروفایل جذب پراکنش محلوت تقریباً از الگویی مشابه با حالت قبل پیروی کرد؛ البته سینتیک آرام‌تری دیده شد که این نکته می‌تواند ناشی از عدم کفايت خنثی شدن بار ساختارهای تشکیل شده و وجود دافعه الکترواستاتیک میان آن‌ها باشد.

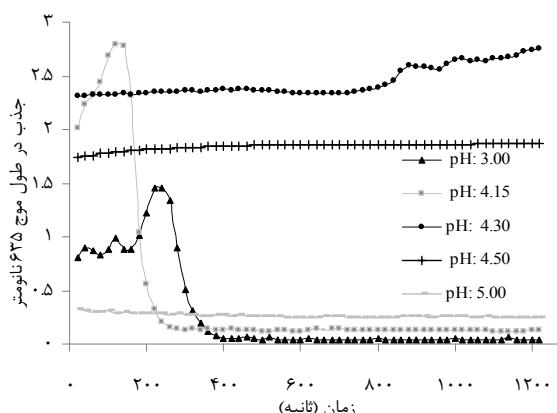
توزیع اندازه‌ی ذرات کمپلکس و کواسرویت در سامانه: برای دستیابی به اطلاعات بیشتر در ارتباط با فرایند توده‌ای شدن مرکب میان بتالاکتوگلوبولین و تراگاکانتین، آنالیز اندازه ذرات برای پراکنش محلوت در pHهای مختلف انجام شد.

بر اساس جدول ۱ از pH ۴/۸۵-۵/۲۰ میانگین حجمی قطر ذرات از ~۱۳۰ میکرون به ~۱۱۳ میکرون رسید همراه با کاهشی بیشتر (به میزان ۳۴٪) در pH ۴/۵۰. به طور غیر قابل انتظار، D کمپلکس‌های تشکیل شده یک کاهش بسیار چشمگیر (۶۰٪) در محدوده‌ی pH ۴/۳۰-۴/۵۰ داشتند.



شکل ۱. پایش جذب تابع pH برای (●): سامانه‌ی بتالاکتوگلوبولین و تراگاکانتین (غلظت کل پلیمر ۳/۰ درصد وزنی و نسبت پروتئین به پلی‌ساقارید ۲ به ۱)، (▲): محلول تراگاکانتین (۱/۰ درصد وزنی). خطوط برای هدایت چشم هستند و فلش‌ها مبنی pH های کلیدی. خطاهای اندازه‌گیری در تعیین pH های کلیدی کمتر از ۱٪ بودند.

از دیدگاه مکانیسم، توده‌ای شدن مرکب یک پدیده‌ی وابسته به زمان است (۲۰) و گذارهایی در مقیاس‌های زمانی مختلف نیز می‌تواند رخ دهد و پایداری سامانه‌های حاوی ذرات کمپلکس یا کواسرویت را تحت تأثیر قرار دهد. از این رو، پروفایل جذب سامانه‌ی بتالاکتوگلوبولین و تراگاکانتین تابع زمان در چند pH مشخص بررسی شد.



شکل ۲. پروفایل وابسته به زمان جذب در pHهای مشخص برای سامانه‌ی بتالاکتوگلوبولین و تراگاکانتین (غلظت کل پلیمر ۳/۰ درصد وزنی و نسبت پروتئین به پلی‌ساقارید ۲ به ۱). خطوط برای هدایت چشم هستند. حداقل انحراف استاندارد در میزان جذب ۳٪ بود.

۱/۰۶، ۱/۲۸، ۱/۷۴، ۱/۱۵ pH=۴/۱۵ میکرون، و در pH=۴/۱۵ بسیار کوچک‌تر و به ترتیب ۲۰، ۲۰ و ۶۰ نانومتر بود.

رفتار رئولوژیک سامانه: ویژگی‌های رئولوژیک یک سامانه‌ی پلیمری رقیق، به خصوصیات ذرات موجود در آن بستگی دارد، مانند: دانسیته بار سطحی، اندازه، شکل، ضخامت لایه آبگیری (۵). بدیهی است ویژگی‌های ذرهای یک پراکنش پروتئین-پلی‌ساکارید در طول پدیده‌ی جدایش فازی تجمعی، متholm تغییرات چشمگیری می‌شود. از این رو، بر آن شدیدم تا از روش رئومتری در جریان اسیدی کردن آرام سامانه‌ی بتالاکتوگلوبولین و تراگاکانتین، برای پایش چگونگی گذارهای ساختاری سامانه، در طول فرایند کمپلکس شدن استفاده کنیم.

نشان داد و به بیان دقیق‌تر به حداقل مقدار خود در pH=۴/۳۰ رسید. پس از آن، با تغییر pH سامانه به مقادیر پایین‌تر، میانگین حجمی قطر ساختارهای تشکیل شده در سامانه به تدریج افزایش یافت. هر چند تفاوت اندکی بین میانگین حجمی قطر ذرات در pH های ۴/۱۵ و ۴/۳۰ وجود داشت، اما توزیع اندازه‌ی ذرات سامانه کاملاً متفاوت بود. در واقع، پهنانی توزیع اندازه‌ی ذرات در pH=۴/۳۰ به طور قابل توجهی بیشتر بود. این موضوع ناهمگونی (Polydispersity) بیشتر سامانه را نشان می‌دهد. برای دریافت جامع‌تر از ذرات بیوپلیمری تشکیل شده در سامانه، توزیع اندازه‌ی ذرات حاصل در pH های ۴/۱۵ و ۵/۲۰ بر اساس تعداد (On a number basis) با استفاده از نرمافزار دستگاه محاسبه شد. مقادیر D_{0.1} و D_{0.5} در pH ۵/۲۰ به ترتیب برابر با

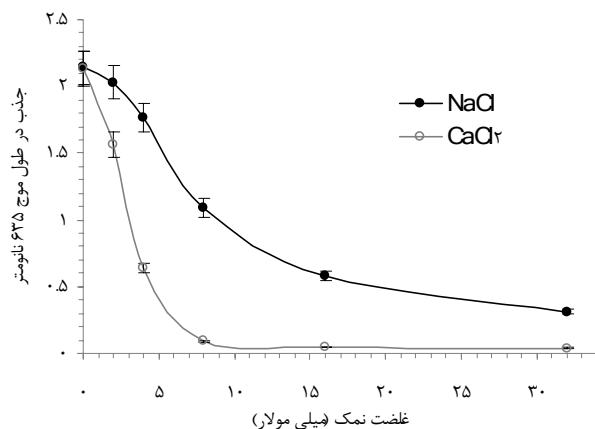
جدول ۱. داده‌های مربوط به توزیع اندازه‌ی ذرات سامانه (بر اساس حجم) بتالاکتوگلوبولین- تراگاکانتین، در pH های مشخص (غلظت کل پلیمر ۳/۰ درصد وزنی و نسبت پروتئین به پلی‌ساکارید ۲ به ۱)

| pH | توزیع اندازه‌ی ذرات (μm) | | | |
|------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| | D _{0.1} | D _{0.5} | D _{0.9} | D [4,3] |
| ۵/۲۰ | ۲۶/۲۵ ± ۱/۸۱ ^e | ۱۰/۵/۶۵ ± ۵/۲۸ ^h | ۲۵۶/۲۸ ± ۱۲/۵۰ ^h | ۱۲۹/۹۱ ± ۵/۱۹ ^h |
| ۴/۸۵ | ۳۲/۵۳ ± ۱/۳۰ ^d | ۹۲/۶۰ ± ۲/۰۷ ^g | ۲۲۴/۴۹ ± ۸/۹۷ ^g | ۱۱۳/۳۵ ± ۴/۵۰ ^g |
| ۴/۵۰ | ۱۳/۵۳ ± ۰/۰۵۵ ^{bc} | ۵۶/۶۵ ± ۲/۲۶ ^f | ۱۶۵/۴۸ ± ۳/۳۰ ^f | ۷۴/۹۵ ± ۲/۹۰ ^{ef} |
| ۴/۳۰ | ۹/۰/۹ ± ۰/۰۳۶ ^a | ۲۴/۴۹ ± ۰/۰۹۷ ^a | ۷۲/۷۳ ± ۲/۸۷ ^b | ۳۰/۶۰ ± ۱/۲۲ ^a |
| ۴/۱۵ | ۱۱/۲۲ ± ۰/۰۴۵ ^{ab} | ۳۲/۳۰ ± ۱/۲۰ ^b | ۶۲/۹۲ ± ۲/۵۱ ^a | ۴۴/۱۶ ± ۱/۳۲ ^b |
| ۴/۰۰ | ۱۳/۵۳ ± ۰/۰۵۴ ^{bc} | ۴۱/۲۵ ± ۱/۲۳ ^c | ۹۷/۶۸ ± ۳/۹۰ ^c | ۵۰/۷۵ ± ۳/۸۰ ^c |
| ۳/۸۵ | ۱۴/۳۹ ± ۰/۰۵۷ ^c | ۴۹/۲۱ ± ۱/۰۶ ^d | ۱۱۵/۱۲ ± ۴/۰۶ ^d | ۵۹/۲۸ ± ۲/۳۷ ^d |
| ۳/۵۰ | ۱۵/۴۴ ± ۰/۰۶۱ ^c | ۵۲/۴۴ ± ۱/۰۷ ^c | ۱۵۷/۰/۹ ± ۴/۷۱ ^e | ۷۱/۲۹ ± ۲/۱۲ ^e |
| ۳/۰۰ | ۱۴/۴۵ ± ۰/۰۵۶ ^c | ۵۷/۱۰ ± ۲/۰۸ ^f | ۱۶۸/۹۷ ± ۶/۷۵ ^f | ۷۵/۸۵ ± ۳/۰۹ ^f |

*میانگین‌هایی که در هر ستون با حروف انگلیسی متفاوت نشان دار شده‌اند، به طور معنی‌دار با یکدیگر متفاوت هستند (p<0.05).

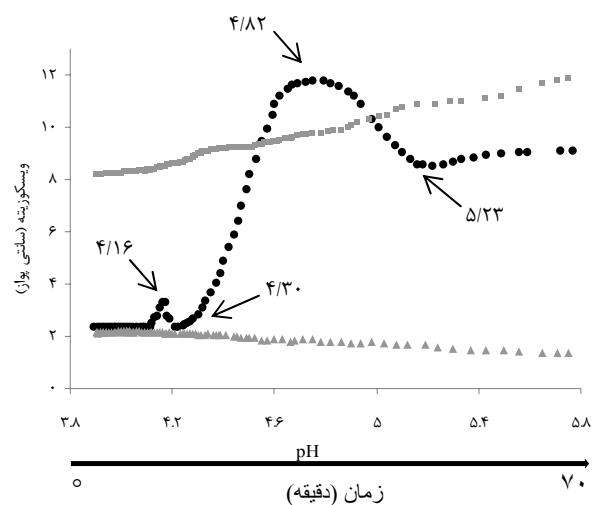
pH=۴/۳۰ به طور قابل توجهی کاهش یافت. در انتهای طیف مکانیکی، به طور غیرقابل انتظاری، یک قله (Peak) جدید در حوالی pH=۴/۱۵ مشاهده شد.

اثر نمک بر میزان میان‌کنش در pH تشکیل ذرات کواسرویت: پدیده جدایش فازی تجمعی با توجه به ماهیت الکترواستاتیک خود به شدت تحت تأثیر قدرت یونی سامانه، از طریق تأثیر آن بر دانسیته بار پلیمرها است (۲۱، ۵). از این منظر، اثر نمک‌های کلرید سدیم و کلرید کلسیم بر مقدار کدورت سامانه - که معیاری از میزان توده‌ای شدن pH مرکب میان‌کنش بتالاکتوگلوبولین و تراگاکانتین است - در بهینه میان‌کنش آن‌ها (۴/۱۵) بررسی شد. نتایج این بررسی در شکل ۴ نشان داده شده است.



شکل ۴. اثر نمک‌های کلرید سدیم (●) و کلرید کلسیم (○) در شش سطح بر میزان جذب در سامانه بتالاکتوگلوبولین و تراگاکانتین در pH = ۴/۱۵ (غلظت کل پلیمر ۳/۰ درصد وزنی و نسبت پروتئین به پلی ساکارید ۲ به ۱). خطوط برای هدایت چشم هستند.

شکل ۴ اثر قوی حضور میکرویون‌ها را بر کاهش میزان میان‌کنش ماکرویون‌های موجود در سامانه به وضوح، نشان می‌دهد. متناظر با افزایش غلظت نمک، کلرید کلسیم در مقایسه با کلرید سدیم با شبیه بیشتری کدورت سامانه را کاهش داد، به طوری که در غلظت ۸ میلی‌مولار میان‌کنش به طور کامل متوقف شد؛ حال آن که در غلظت ۳۲ میلی‌مولار کلرید سدیم کدورت سامانه حدود ۰/۳ بود.



شکل ۳. پایش ویسکوزیته ظاهری تابع pH در نرخ برش ثابت 5 s^{-1} برای (●): سامانه بتالاکتوگلوبولین و تراگاکانتین (غلظت کل پلیمر ۳/۰ درصد وزنی و نسبت پروتئین به پلی ساکارید ۲ به ۱)، (▲): محلول بتالاکتوگلوبولین (غلظت پلیمر ۲/۰ درصد وزنی)، (■): محلول تراگاکانتین (غلظت پلیمر ۳/۰ درصد وزنی). فلاش‌های مورب مبین pH های کلیدی و فلاش افقی مبین مقیاس زمانی است. حداقل خطای اندازه‌گیری در تعیین pH های کلیدی ۰/۵ درصد و در مقدار ویسکوزیته گزارش شده در این pH ها ۰/۳ درصد بود.

شکل ۳ پایش ویسکوزیته سامانه‌های مخلوط و شاهد را تابع زمان اسیدی شدن (یا کاهش pH) نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، ویسکوزیته محلول بتالاکتوگلوبولین در طول زمان، در نتیجه ساختار یافتن سامانه، کمی افزایش یافت، در حالی که ویسکوزیته محلول تراگاکانتین تابع pH به طور ملایم و یکنواخت کاهش یافت. این کاهش را می‌توان به جمع شدن (shrinkage) نسبی ساختار ملکول‌های تراگاکانتین، به دنبال کاهش دافعه الکترواستاتیک میان واحدهای ارونیک اسید پلی ساکارید نسبت داد. طیف مکانیکی پراکنش مخلوط، در مقایسه با سامانه‌های شاهد پیچیده‌تر بود و گذارهای ساختاری آشکاری را متناظر با کاهش pH نشان داد. پس از یک دوره ثبات در میزان ویسکوزیته سامانه، از pH=۵/۲۳ مقدادر ویسکوزیته متناظر با زمان اسیدی شدن شروع به افزایش کرد تا آنجا که به بیشینه مقدار خود در pH=۴/۸۲ رسید. پس از این افزایش اولیه، ویسکوزیته مخلوط تا رسیدن به

• بحث

سامانه‌ای حاوی بتالاکتوگلوبولین و پکتین گزارش کرده‌اند (۸). در این محدوده pH، کاهش اندازه‌ی ذرات اندک بود و به نظر می‌رسد سازمان یابی دوباره‌ی حلال و منظم شدن ملکول‌های آب در سطح کمپلکس (۲۳) مسئول افزایش ویسکوزیتی سامانه است. برخلاف این مشاهده، گزارش شده EPS B40 در pH تشكیل کمپلکس‌های محلول کاهش یافت (۲۴). این نتیجه‌ی مخالف می‌تواند ناشی از پاسخ نرم‌شونده با برش (Shear thinning) نمونه باشد که به وسیله‌ی ویسکومتر (Capillary viscometer Ubbelhode) ایجاد شده است. به طور کلی، این ویسکومتر در گروه ویسکومترهای با نرخ برش بالا طبقه‌بندی می‌شود (۲۵). به طور مشابه، هنگامی که ما آزمون‌ها را در نرخ برش 85 s^{-1} انجام دادیم، افزایش در ویسکوزیتی مشاهده نشد (نتایج نشان داده نشده است).

pH=۴/۳۰-۴/۸۵ : دومین گذار در میزان جذب سامانه در pH=۴/۸۵ دیده شد. به نظر می‌رسد هم ابوهی کمپلکس‌های درون پلیمری از این pH آغاز می‌شود. به بیان دیگر، از آن جا که دانسیته بار ملکول‌های بتالاکتوگلوبولین به موازات کاهش pH افزایش پیدا می‌کند، پروتئین‌های کمپلکس شده می‌توانند با واحدهای تراگاکانتین که در بتالاکتوگلوبولین آشکار می‌کند. در توافق با این مشاهده گزارش شده است که این پروتئین در نتیجه‌ی دارا بودن نواحی با بار مثبت (Positive patches) در سطح ملکول خود (روی پپتیدهای ۱۴-۱، ۱۴۸-۱۳۲ و ۸۳-۷۶، ۶۰-۴۱) می‌تواند با یک پلی‌آنیون به صورت مکانی در pHهایی برابر با کمی بالاتر از pH ایزوکتریک خود وارد میانکنش شود (۸، ۲۲). همان طور که پیش از این بیان شد، از pH=۵/۲۳ مقدار ویسکوزیتی متناظر با زمان اسیدی شدن شروع به افزایش کرد؛ تا آن جا که به حداقل مقدار خود در pH=۴/۸۲ رسید. این محدوده از pH متناظر با تشکیل و توسعه‌ی کمپلکس‌های محلول است. چنین کمپلکس‌هایی که به شدت هیدراته هستند، از زنجیره‌های منفرد پلی-ساکارید تشکیل شده‌اند که با تعداد کمی ملکول پروتئین اتصال دارند (۳). در تشکیل این ساختارهای مرکب علاوه بر نیروهای الکترواستاتیک، پیوندهای هیدروژنی (میان گروه‌های استری تراگاکانتین و گروه‌های هیدروکسیل، آمید و کربوکسیل بتالاکتوگلوبولین) نیز ممکن است نقش داشته باشند؛ همانطور که Girard و همکاران (۲۰۰۲) برای

تعیین pHهای کلیدی، میانکنش‌های بحرانی سامانه در جریان جدایش فازی تجمعی بتالاکتوگلوبولین و تراگاکانتین: به دنبال آنالیز نتایج حاصل از سه تکنیک تکمیل کننده (طیفسنجی نور مرهی، تفرق نور لیزر و رئولوژی) رفتار کلوفیلی سامانه با تعیین pHهای کلیدی که میانکنش‌های کلیدی در جریان میانکنش دو پلیمر است، پایش شد. در ادامه، روند فرایند جدایش فازی تجمعی و تشکیل گونه‌های مختلف ذرات بیopolymerی در غالب پنج ناحیه‌ی محدود شده با pH مورد بحث قرار خواهد گرفت.

pH=۵/۲۰-۶/۰۰ : در این محدوده، مقادیر جذب اندک و ثابت، و ویسکوزیتی سامانه بدون تغییر بود. این امر نشان از حضور دو پلیمر در حالت هم- محلولی (Co-solubility) دارد. در این حالت، ملکول‌های بتالاکتوگلوبولین که در pH بالاتر از pH ایزوکتریک خود (۵/۱۵) قرار دارند، و نیز ملکول‌های تراگاکانتین بار خالص منفی دارند؛ از این رو، برآیند واکنش آن‌ها از نوع دافعه است.

pH=۴/۸۵-۵/۲۰ : از حدود pH=۵/۲۰ پارامترهای ثبت شده (جذب و ویسکوزیتی) به طور معنی‌داری شروع به افزایش کردند. این امر تشکیل کمپلکس‌های محلول و درون پلیمری را در بالاتر از pH ایزوکتریک بتالاکتوگلوبولین آشکار می‌کند. در توافق با این مشاهده گزارش شده است که این پروتئین در نتیجه‌ی دارا بودن نواحی با بار مثبت (Positive patches) در سطح ملکول خود (روی پپتیدهای ۱۴-۱، ۱۴۸-۱۳۲ و ۸۳-۷۶، ۶۰-۴۱) می‌تواند با یک پلی‌آنیون به صورت مکانی در pHهایی برابر با کمی بالاتر از pH ایزوکتریک خود وارد میانکنش شود (۸، ۲۲). همان طور که پیش از این بیان شد، از pH=۵/۲۳ مقدار ویسکوزیتی متناظر با زمان اسیدی شدن شروع به افزایش کرد؛ تا آن جا که به حداقل مقدار خود در pH=۴/۸۲ رسید. این محدوده از pH متناظر با تشکیل و توسعه‌ی کمپلکس‌های محلول است. چنین کمپلکس‌هایی که به شدت هیدراته هستند، از زنجیره‌های منفرد پلی-ساکارید تشکیل شده‌اند که با تعداد کمی ملکول پروتئین اتصال دارند (۳). در تشکیل این ساختارهای مرکب علاوه بر نیروهای الکترواستاتیک، پیوندهای هیدروژنی (میان گروه‌های استری تراگاکانتین و گروه‌های هیدروکسیل، آمید و کربوکسیل بتالاکتوگلوبولین) نیز ممکن است نقش داشته باشند؛ همانطور که Girard و همکاران (۲۰۰۲) برای

محیط نسبت داد، این موضوع در ابتدا ناشی از هم جوشی واحدهای ساختاری است. در H^+ های پایین‌تر، کمپلکس‌ها دوباره به سوی محلول شدن پیش می‌روند و سرانجام در حوالی $pH = 2/5$ توده‌ای شدن مرکب به طور کامل متوقف می‌شود. زیرا در این شرایط ملکول‌های تراگاکانتین برای میان‌کنش با ملکول‌های با بار مثبت بتالاکتوگلوبولین به تعداد کافی بار منفی ندارند. متناظر با کاهش جاذبه‌ی الکترواستاتیک میان واحدهای کمپلکس‌دهنده، ملکول‌های تراگاکانتین به آرایش فضایی گسترشده خود باز می‌گردند و میانگین حجمی قطر ساختارهای تشکیل شده به تدریج افزایش می‌کند.

اثر نمک بر میزان میان کنش در pH تشکیل ذرات کواسرویت: متناظر با افزایش غلظت نمک، مقادیر جذب سامانه بتالاکتو-گلوبولین- تراگاکانتین کاهش یافت. این مشاهده حاکی از اثر قوی نمک بر تشکیل کمپلکس و تأثیری بر ماهیت الکترواستاتیک میان کنش این دو پلیمر است. این یافته در توافق با پژوهش های پیشین است که بیان می کند حضور نمک باعث تضعیف پدیدهی تودهای شدن مرکب می شود و کمپلکس های حاصل ساختاری هتروژن و آبکی خواهند داشت؛ و حتی در حضور غلظت های بالای نمک، تشکیل کمپلکس به طور کامل متوقف می شود (۳۲، ۴۲). افزایش غلظت نمک باعث کاهش مؤثر طول دبای فاصلهی نقاط (Site) مثبت پروتئین و نقاط منفی پلی ساکارید می شود. در نتیجه، بار سطحی پلیمرها توسط میکرویون های موجود در سامانه پوشیده می شود (۳۳، ۲۱). در چنین شرایطی پروتئین و پلی ساکارید بار لازم برای شرکت در میان کنش الکترواستاتیک را نخواهند داشت. کاتیون کلسیم با شعاع یونی کوچکتر خود، در مقایسه با کاتیون سدیم نقش بازدارندهی بیشتری داشت، به طوری که در غلظت ۸ میلی مولار باعث توقف کامل میان کنش بتالاکتو-گلوبولین- و تراگاکانتین شد.

این پژوهش نشان داد تحت شرایط کنترل شده pH، میان کنش‌های الکترواستاتیک بتالاکتوگلوبولین و تراگاکانتین به تشکیل گونه‌های مختلف بیوپلیمری مانند کمپلکس‌های اولیه، کمپلکس‌های میان‌پلیمری و ذرات کواسرویت منتهی می‌شود. میکروذرات طبیعی حاصل می‌تواند برای ریزپوشینه کردن، محافظت و تحويل ترکیبات عملگرا و فعال مانند ویتامین‌ها، مواد معدنی، اسیدهای چرب، آنزیمهای و

روند مشاهده شده می‌تواند به افزایش جرم مولی ذرات تشکیل شده نیز نسبت داده شود. در این محدوده H_2O ویسکوزیته‌ی سامانه به شدت کاهش پیدا کرد. همان‌طور که قبلاً بحث شد، کمپلکس‌های اولیه از حوالی $\text{pH}=4/80$ نوعی هم انبوهی را تجربه می‌کنند. خنثی شدن متقابل درشت واکنش‌گرها (Macro-reactant) که با آزاد شدن ملکول‌های آب (۲۷) و احتمالاً شکسته شدن پیوندهای هیدروژنی (۲۸) همراه است، به جمع و فشرده شدن ساختارهای در حال شکل‌گیری منجر می‌شود. در حقیقت، آرایشی فضایی شبیه به پروتئین‌های کروی تشکیل می‌شود. این وقایع می‌تواند کاهش مشاهده شده در ویسکوزیته‌ی سامانه را توجیه کند. در توافق با مطالعه‌ی حاضر کاهش معنی داری در ویسکوزیته‌ی سامانه‌های پروتئین-پلی ساکارید در طول فرایند کمپلکس شدن گزارش شده است. چنین رفتاری همان‌طور که توسط *Bungenberg de Jong* پیشنهاد شده است، به کاهش میزان آب به دام افتاده درون کمپلکس‌ها نسبت داده می‌شود (۳۹-۳۱).

pH=۴/۱۵-۴/۳۰: در این محدوده، مقدار جذب اندکی کاهش یافت و در pH=۴/۱۵ پروفایل جذب سامانه تابع زمان جدایش فازی بسیار سریعی را نشان داد. این سینتیک سریع پیشنهاد می‌کند که باز کمپلکس‌ها نزدیک به حالت خشی است و توده‌ای شدن مرکب رخ داده است. از سوی دیگر، میانگین حجمی قطر ساختارهای تشکیل شده در مقایسه با pH=۴/۳۰ کمی افزایش یافتب و توزیع اندازه‌ی ذرات نیز هموژن‌تر شد، این موضوع مبنی ظهرور جمعیت جدیدی از ذرات در نتیجه انجام توده‌ای شدن مرکب است. شایان ذکر است توزیع اندازه‌ی ذرات بر اساس تعداد در pH پیش گفته حاکی از حضور تعداد بسیار زیادی نانو ذرات بیوپلیمری مرکب در محیط است. همان طور که پیش از این اشاره شد، در انتهای طیف مکانیکی سامانه، به طور غیرقابل انتظاری، یک پیک جدید در حوالی pH=۴/۱۵ مشاهده شد؛ جایی که به نظر می‌رسد pH بهینه توده‌ای شدن مرکب بوده و نیز، قدرت نیروهای الکترواستاتیک بیشینه است. این رفتار رئولوژیک ممکن است ناشی از یک سری تغییرات در آرایش فضایی پلیمرهای شرکت پذیر باشد. افزایش اندازه‌ی ذرات سامانه و نیز هموژن بودن آن‌ها می‌تواند توضیح دیگری برای این پدیده باشد.

pH = ۴/۱۵ - ۴/۵۰ : کاهش میزان جذب سامانه در این محدوده pH را می‌توان به کم شدن تعداد ذرات هدف در

سپاسگزاری

این مقاله، حاصل بخشی از طرح پژوهشی "مطالعه برخی عوامل فیزیکیو-شیمیایی مؤثر بر تشکیل کمپلکس‌های بتا-لакتوگلوبولین و صمغ کتیرا تراویده از گون گونه‌های آسترالکالوس گوسسیپینوس و آسترالکالوس فلوکوسوس" است، و با حمایت مالی انسستیتو تحقیقات تغذیه و صنایع غذایی انجام شد. به این وسیله از حمایت‌های مالی گروه تحقیقات صنایع غذایی و مرکز استعدادهای درخشنان دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تشكر و قدردانی می‌شود.

پروپیوتیک‌ها به کار گرفته شوند. این ذرات ممکن است به دنبال تغییر pH یا قدرت یونی محیط نهایی دستخوش جدایش شوند که در برخی موارد می‌تواند به عنوان یک محدودیت مطرح شود. اما رویکردهایی مانند تیمار حرارتی برای رویارویی با این محدودیت وجود دارد. این مطالعه می‌تواند به عنوان پایه‌ای برای پژوهش‌های بعدی در راستای دستیابی به میکرو و نانو ذرات بیopolymerی پایدار باشد.

• References

- Cooper C, Dubin P, Kayitmazer A, Turksen S. Polyelectrolyte-protein complexes. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 2005;10(1):52-78.
- Schmitt C, Turgeon SL. Protein/polysaccharide complexes and coacervates in food systems. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 2011;16(1):63-70.
- Turgeon SL, Laneuville SI. Protein+polysaccharide coacervates and complexes: from scientific background to their application as functional ingredients in food products. modern biopolymer science: Bridging the Divide Between Fundamental Treatise and Industrial Application. 2009:327.
- Tolstoguzov V. Some thermodynamic considerations in food formulation. *Food Hydrocoll* 2003;17(1):1-23.
- Schmitt C, Sanchez C, Desobry-Banon S, Hardy J. Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1998;38(8):689-753.
- Kaibara K, Okazaki T, Bohidar H, Dubin P. pH-induced coacervation in complexes of bovine serum albumin and cationic polyelectrolytes. *Biomacromolecules* 2000;1(1):100-7.
- Weinbreck F. Whey protein- polysaccharide coacervates: structure and dynamics [PhD thesis]. The Netherlands: Utrecht Univrsity; 2004.
- Girard M, Sanchez C, Laneuville SI, Turgeon SL, Gauthier SF. Associative phase separation of β -lactoglobulin/pectin solutions: a kinetic study by small angle static light scattering. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 2004;35(1):15-22.
- Sanchez C, Mekhloufi G, Renard D. Complex coacervation between β -lactoglobulin and Acacia gum: A nucleation and growth mechanism. *J colloid Interface Sci*. 2006;299(2):867-73.
- Hambling SG, McAlpine AS, Sawyer L. β -Lactoglobulin. In: Fox PF, editor. Advanced dairy chemistry. London: Blackie Academic & Professional; 1997.
- Evans MTA, Gordon JF. Why proteins. In: Grant AR, editor. Applied protein chemistry .London: Applied sciences; 1979.
- Weiping W, Branwell A. Tragacanth and karaya. In: Phillips GO, Williams PA, editor. Handbook of Hydrocolloids. Cambridge: Wood head publishing Ltd; 2000.
- Kiumarsi A. The gum tragacanth from Iranian *Astragalus Microcephalus* [PhD thesis]. New Zealand: University of Otago; 1997.
- Mohammadifar MA, Musavi SM , Kiumarsi A, Williams PA. Solution properties of tragacanthin (water-soluble part of gum tragacanth exudate from *Astragalus gossypinus*). *Int J Biol Macromol* 2006; 38:31-9.
- Azarkia F, Abbasi S. On the stabilization mechanism of Doogh (Iranian yoghurt drink) by gum tragacanth. *Food Hydrocoll* 2010;24(4):358-63.
- Gorji EG, Mohammadifar MA, Ezzatpanah H. Influence of gum tragacanth, *Astragalus gossypinus*, addition on stability of nonfat Doogh, an Iranian fermented milk drink. *Int J Dairy Tech* 2011; 64: 262-8.
- Hassandokht Firouz M, Mohammadifar MA. Characterization of complexation and coacervation between β -lactoglobulin and soluble fraction of gum tragacanth: Approached by spectroscopic, rheometric and light scattering methodologies. Proceedings of the 6th International Symposium on Food Rheology and Structure, 2012 Aprile 10-13, Zurich, Switzerland (Talk); pp.124.

18. Balaghi S, Mohammadifar MA, Zargaraan A. Physicochemical and rheological characterization of gum tragacanth exudates from six species of Iranian Astragalus. *Food Biophys.* 2010;5(1):59-71.
19. Hasandokht Firooz M, Mohammadifar MA, Haratian P. Self-assembly of β -lactoglobulin and the soluble fraction of gum tragacanth in aqueous medium. *Int J Biol Macromol* 2012;5:925-31.
20. Sanchez C, Mekhloufi G, Schmitt C, Renard D, Robert P, Lehr CM, et al. Self-assembly of β -lactoglobulin and acacia gum in aqueous solvent: Structure and phase-ordering kinetics. *Langmuir* 2002;18(26):10323-33.
21. Seyrek E, Dubin PL, Tribet C, Gamble EA. Ionic strength dependence of protein-polyelectrolyte interactions. *Biomacromolecules* 2003;4(2):273-82.
22. Girard M, Sanchez C, Laneuville SI, Turgeon SL, Gauthier SF. Associative phase separation of β -lactoglobulin/pectin solutions: a kinetic study by small angle static light scattering. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 2004;35(1):15-22.
23. Jelesarov I, Bosshard HR. Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. *J Mol Recognit* 1999; 12(1):3-18.
24. Weinbreck F, Nieuwenhuijse H, Robijn GW, de Kruif CG. Complex formation of whey proteins: exocellular polysaccharide EPS B40. *Langmuir* 2003;19(22):9404-10.
25. Shawki S, Hamielec A. The effect of shear rate on the molecular weight determination of acrylamide polymers from intrinsic viscosity measurements. *J Appl Polym Sci* 1979;23(11):3323-39.
26. Mekhloufi G, Sanchez C, Renard D, Guillemin S, Hardy J. pH-induced structural transitions during complexation and coacervation of β -lactoglobulin and acacia gum. *Langmuir* 2005; 21(1):386-94.
27. Xia J, Dubin PL, Kim Y, Muhoberac BB, Klimkowski VJ. Electrophoretic and quasi-elastic light scattering of soluble protein-polyelectrolyte complexes. *J Phys Chem* 1993;97(17):4528-34.
28. Aberkane L, Jasniewski J, Gaiani C, Scher J, Sanchez C. Thermodynamic Characterization of Acacia Gum- β -Lactoglobulin Complex Coacervation. *Langmuir*. 2010; 26(15):12523-33.
29. Bungenberg de Jong H. Crystallisation-coacervation-flocculation. In: Kruyt HG editor. *Colloid science*. Amsterdam: Elsevier; 1949: vol 2, 232-58.
30. Koh G, Tucker I. Characterization of sodium carboxymethylcellulose-gelatin complex coacervation by viscosity, turbidity and coacervate wet weight and volume measurements. *J Pharm Pharmacol* 1988;40(4):233-6.
31. Malay Ö, Bayraktar O, Batığün A. Complex coacervation of silk fibroin and hyaluronic acid. *Intel. J. of Biol. Macromol.* 2007;40(4):387-93.
32. Weinbreck F, De Vries R, Schrooyen P, De Kruif C. Complex coacervation of whey proteins and gum arabic. *Biomacromolecules* 2003;4(2):293-303.
33. Bowman W, Rubinstein M, Tan J. Polyelectrolyte-gelatin complexation: Light-scattering study. *Macromolecules* 1997;30(11):3262-70.

Studies on the electrostatic interactions between β -lactoglobulin and tragacanthin: The first step towards fabrication of biopolymeric micro- and nano-particles

Hassandokht Firouz M¹, Haratian P², Komeili Fanood R³, Mohammadifar MA *⁴

1- M.Sc. in Food Science and Technology, National Nutrition & Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

2- Lecturer, Dept. of Food Science and Technology, National Nutrition & Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

3- Researcher, Dept. of Food Technology Research, National Nutrition & Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

4- *Corresponding author: Associate Prof. Dept. of Food Science and Technology, National Nutrition & Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Received 5 Jun, 2012

Accepted 8 Sept, 2012

Background and Objective: Investigation of the colloidal behaviour of protein-polysaccharide systems is becoming increasingly important to provide a foundation for their applications in areas such as production of biopolymer micro-and nano-particles, designing food analogues, and microencapsulation technology. The aim of the present study was to investigate the pH-induced critical transitions during associative phase separation between β -lactoglobulin (BLG) and tragacanthin (T).

Materials and Methods: The formation of electrostatic complexes in BLG/T dispersions (0.3wt.% total concentration; BLG:T ratio 2:1) was investigated as a function of pH (2.00-6.00) by spectrophotometry and particle size analysis. In addition, coupling of slow *in situ* acidification of the blend, with glucono-delta-lacton, and rheometry were used to monitor the structural transitions during the associative phase separation. The influence of salt type and concentration on the formation of micro-particles were also determined.

Results: The formation of soluble complexes started at pH ~5.20, and at pH ~4.85 the aggregation of intrapolymeric complexes occurred, followed by a bulk phase separation at pH ~4.30. The data indicated that coacervation occurred at pH 4.15. Finally, the mixture returned to a mono-phasic system at pH 2.5. Particle size analysis showed that the assembled structures experienced a contraction process upon complexation. Rheometry provided deeper insights into the colloidal behaviour of the system and the results were in good agreement with quiescent pH-induced transitions established by HCl titration. The formation of the micro-particles was strongly salt-dependent.

Conclusion: Under controlled pH conditions, electrostatic interactions between β -lactoglobulin and tragacanthin can be used to form a variety of biopolymer particles. These biopolymeric micro- and nano-particles may be used in the food industry as natural delivery systems or fat-replacers.

Keywords: β -Lactoglobulin, Tragacanthin, Protein-polysaccharide interactions, Associative phase separation, Biopolymer micro-particles