

بررسی میان کنش های الکترواستاتیک بتالاکتوگلوبولین و تراگاکانتین:

گام نخست به سوی تولید میکرو و نانو ذرات بیوپلیمری

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

- ۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه ای و صنایع غذایی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
- ۲- مربی گروه آموزشی علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه ای و صنایع غذایی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
- ۳- کارشناس گروه تحقیقات صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه ای 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، انستیتو تحقیقات تغذیه ای 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 دریافت: ۹۱/۳/۱۶

تاریخ پذیرش: ۹۱/۶/۱۸

چکیده

سابقه و هدف: بررسی رفتار کلوئیدی سامانه های پروتئین- پلی ساکارید، اهمیت روزافزونی برای فراهم آوری پایه ای مناسب در راستای دستیابی به کاربردهای مختلف آن ها (مانند تولید میکرو و نانو ذرات بیوپلیمری، طراحی آنالوگ های 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 روش ها: تشکیل کمپلکس های الکترواستاتیک در پراکنش های حاوی مخلوط بتالاکتوگلوبولین و تراگاکانتین (غلظت کل پلیمر ۰/۳ درصد وزنی و نسبت پروتئین به پلی-ساکارید ۲ به ۱) تابع pH (۶-۲) با استفاده از طیف سنجی و آنالیز اندازه ذرات بررسی شد. از رنومتری به موازات اسیدی کردن آرام پراکنش مخلوط، با گلوکونودلتالاکتون، برای پایش گذارهای ساختاری سامانه استفاده شد. اثر نوع و غلظت نمک روی تشکیل میکروذرات حاصل تعیین شد.

یافته ها: تشکیل کمپلکس های محلول در pH=۵/۲۰ آغاز شد؛ در pH=۴/۸۵ انبوهش کمپلکس های درون پلیمری رخ داد و به انجام جدایش فازی در pH=۴/۳۰ منتهی شد. پارامترهای ثبت شده نشان داد که توده ای شدن مرکب در pH=۴/۱۵ رخ می دهد. در نهایت، مخلوط به حالت یک سامانه ی تک فازی در pH=۲/۵۰ بازگشت. آنالیز اندازه ی ذرات نشان داد که ساختارهای مرکب نوعی فرایند جمع و فشرده شدن را در جریان کمپلکس شدن تجربه می کنند. رنومتری دریافت های عمیق تری از رفتار کلوئیدی 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.

نتیجه گیری: تحت شرایط کنترل شده pH، میان کنش های الکترواستاتیک بتالاکتوگلوبولین و تراگاکانتین می تواند برای تشکیل گونه های مختلف ذرات بیوپلیمری به کار گرفته شود. این میکرو و نانو ذرات حاصل می توانند در صنعت غذا به عنوان سامانه های تحویل دهنده ی طبیعی یا جایگزین چربی به کار روند.

واژگان کلیدی: بتالاکتوگلوبولین، تراگاکانتین، میان کنش های پروتئین- پلی ساکارید، جدایش فازی تجمعی، میکروذرات بیوپلیمری

• مقدمه

از سامانه های 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 می تواند به عنوان یک عامل کلیدی در توسعه فرآورده ها و فرایندهای نوین صنعت غذا

طی دو دهه اخیر، انگیزش چشمگیری در راستای طراحی و بهینه سازی سامانه های چندفازی با میان کنش درشت ملکول های طبیعی پدیدار شده است (۳-۱). پروتئین ها و پلی ساکاریدها اغلب در کنار یکدیگر در بسیاری

باشد. زیرا میان کنش پیش گفته، ویژگی های عملکردی پروتئین های غذایی از جمله ویژگی های مربوط به جذب آب (حلالیت و ویسکوزیته)، ویژگی های ساختاری (هم انبوهی Aggregation و تشکیل ژل) و خصوصیات سطحی (قابلیت امولسیفایری و تشکیل کف) را به شدت تحت تأثیر قرار می دهد (۵).

پراکنش های (Dispersions) رقیق این دو پلیمر طبیعی، در نتیجه ی بالا بودن انرژی آزاد اختلاط سامانه اغلب ناپایدار است و دچار جدا شدن فازی می شود (۴). هنگامی که برآیند میان کنش دو نوع پلیمر که عمدتاً الکترواستاتیک است، از نوع جاذبه باشد، ابتدا کمپلکس های محلول درون پلیمری (Intrapolymeric complexes) و سپس با پیشرفت فرایند و کاهش pH، کمپلکس های میان پلیمری (Interpolymeric complexes) و در نهایت با گذشت زمان فازی کنسانتره و غنی از دو پلیمر (فاز کواسرویت یا توده شده Coacervate phase) تشکیل می شود. فاز دیگر عمدتاً شامل حلال خواهد بود. این پدیده که از آن تحت عنوان جدایش فازی تجمع (Associative phase separation) یا توده ای شدن مرکب (Complex coacervation) یاد می شود، نوعی جدایش فازی به صورت مایع/مایع است (۶، ۷) و تحت سازوکار هسته زایی و رشد انجام می شود (۸، ۹). شایان ذکر است این پدیده و خصوصیات فیزیکی شیمیایی کمپلکس های حاصل از آن بسیار متأثر از عوامل درونی سامانه است، مانند: pH، قدرت یونی، نسبت پروتئین به پلی ساکارید، غلظت کل پلیمر در سامانه و موارد دیگر. عوامل فرایند (حرارت و فشار) نیز تأثیرگذار هستند (۵).

پدیده توده ای شدن مرکب، موضوع مورد توجه برای تحقیقات بنیادی به ویژه درک سازوکار فرایندهای زیستی در حیطه بیولوژی و نانوبیوتکنولوژی است. از دیدگاه کارکردی، استفاده از این پدیده در زمینه های مختلف بسیار رو به رشد بوده است، مانند: خالص سازی پلیمرها (با کارایی بیشتر و ارزان تر در مقایسه با روش های متداولی مانند کروماتوگرافی)، فرمولاسیون های غذایی (جایگزین چربی، گوشت و عامل بافت دهنده)، ساخت مواد زیستی (پوشش های خوراکی، پیوند اعضای مصنوعی)، ریزپوشینه کردن مواد غذایی و دارویی (انواع ریز مغذی ها و مواد مولد طعم) و تولید میکرو و نانوذرات بیوپلیمری (۵، ۲).

بتا لاکتوگلوبولین که حدود ۵۰٪ پروتئین های آب پنیر را تشکیل می دهد، پروتئینی کوچک و کروی، با وزن ملکولی ۱۸۳۵۰ دالتون است (۱۰). این پروتئین در ترکیب فرمولاسیون های غذای کودک و غذاهای رژیمی به دلیل ارزش تغذیه ای بالا و نیز به عنوان یک عامل ساختاردهنده ی اولیه، استفاده می شود (۱۱). شایان ذکر است، این پلیمر طبیعی را می توان از آب پنیر بازیافت کرد که شامل بخش عمده ای از ضایعات صنایع لبنی می شود.

صمغ کتیرا که یک پلی ساکارید منشعب و هتروژن است، تراوه ی خشک شده ی 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/افزودنی های مواد غذایی WHO/FAO (Joint WHO/FAO Expert Committee on Food Additives) تحت عنوان بالاترین رده ارزیابی امنیت غذایی (ADI not Specified) طبقه بندی شده است. این هیدروکلئید که پایداری اسیدی آن بسیار بالاست، به عنوان یک عامل سوسپانسیون کننده، پایدارکننده، امولسیون کننده و قوام دهنده در صنایع دارویی، آرایشی و به ویژه صنایع غذایی کاربرد دارد. صمغ کتیرا از دو جزء اصلی تشکیل شده است: تراگانانتین (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 صمغ کتیرای ایرانی در حدود 3×10^6 تعیین شده است (۱۳). در پژوهشی دیگر، وزن ملکولی تراگانانتین در محدوده $10^5 \times 1/8$ تا $10^6 \times 1/6$ گزارش شده است (۱۴). اخیراً، پژوهش های انجام شده در زمینه ی اثر افزودن صمغ کتیرا بر دوغ پیشنهاد کرده اند که میان کنش های الکترواستاتیک پروتئین های شیری با جزء محلول صمغ در سازوکار پایدارسازی این نوشیدنی نقش کلیدی دارد (۱۶، ۱۵).

استفاده بهینه از میان کنش های پروتئین ها و پلی ساکاریدها برای توسعه فرآورده ها و فرایندهای نوین صنعت غذا، منوط به داشتن داده های بنیادی است. از این رو، طی دهه اخیر، بررسی رفتار کلئیدی سامانه های پروتئین-پلی ساکارید یکی از پرکارترین حوزه های پژوهش های پایه ای در صنعت غذا بوده است (۱۷، ۳-۱).

پژوهش حاضر به تحقیق و توصیف پدیده ی توده ای شدن مرکب میان بتالاکتوگلوبولین و صمغ کتیرای تراویده از

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 غلظت کل پلیمر و نسبت پروتئین به پلی‌ساکارید به ترتیب ۰/۳ درصد وزنی و ۲ به ۱ بود. نمونه‌ها با به کارگیری اسید کلریدریک ۰/۰۱، ۰/۱ و ۱ نرمال (و در صورت نیاز سود ۰/۰۱ و ۰/۱ نرمال) از pH=۲-۷ اسیدی شدند. پس از تنظیم pH مخلوط در میزان مورد نظر، نمونه‌ای برای انجام آزمون‌های طیف‌سنجی نوری و نمونه‌ی دیگری برای اندازه‌گیری توزیع اندازه ذرات برداشت شدند. برای انجام آزمون‌های رئولوژیک، پراکنش مخلوط با pH اولیه ۷ با به کارگیری گلوکونودلتالاکتون به آرامی اسیدی شد. برای پوشش محدوددهی مورد نظر (pH=۳/۸-۷) در حدود ۰/۱۴ درصد وزنی گلوکونودلتالاکتون به مخلوط اضافه شد. سپس، به منظور حل شدن یکنواخت آن، مخلوط تحت هم‌زدن آرام در دمای $0/1^{\circ}\text{C} \pm 22$ 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 ۲، ۴، ۸، ۱۶ و ۳۲ میلی‌مولار تنظیم شد. نمونه‌های شاهد (حاوی بتالاکتوگلوبولین یا تراگاکانتین) تحت شرایط مشابه با پراکنش مخلوط برای هر آزمون آماده شدند.

آزمون‌های طیف‌سنجی: میزان جذب سامانه مدل با استفاده از دستگاه طیف سنج مرئی-ماورای بنفش (SP-300 PLUS Optima، ژاپن) در طول موج ۶۳۵ نانومتر (مشابه با طول موج نور لیزر به کار رفته برای آزمون‌های اندازه‌گیری اندازه‌ی ذرات) در دمای 22°C اندازه‌گیری شد. برای آزمون‌های طیف سنجی وابسته به زمان، ۳ml نمونه درون کوت (با طول مسیر عبور نور برابر با ۱cm) ریخته شد و میزان جذب سامانه طی ۲۰ دقیقه پایش شد (هر ۲۰ ثانیه).

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

گون گونه *آسترگالوس فلوکوسوس* در یک سامانه‌ی مدل می‌پردازد. با به کارگیری سه تکنیک تکمیل‌کننده (طیف‌سنجی نور مرئی، تفرق نور لیزر و رئولوژی) رفتار کلوئیدی سامانه و تشکیل گونه‌های مختلف ذرات بیوپلیمری با تعیین pH‌های کلیدی (که مبین گذارهای بحرانی سامانه در جریان میان‌کنش هستند) پایش می‌شود. با توجه به این که ۷۰٪ صمغ 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 صمغ 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 ۹۰٪ (Sigma Aldrich Chemical Co.، آمریکا) خریداری شد و بدون خالص‌سازی بیشتر مورد استفاده قرار گرفت. نمونه‌های کتیرای تراویده از گون گونه *آسترگالوس فلوکوسوس* به کمک کارشناسان/دوره کل منابع طبیعی/استان سمنان جمع‌آوری شد. نمونه‌ها با استفاده از آسیاب، پودر شده و با به کارگیری الک‌های با مش‌های مختلف، پودرهای بین ۲۰۰ تا ۵۰۰ میکرون به دست آمد. برای آماده سازی جزء محلول صمغ، ابتدا پراکنش ۱ درصد وزنی آن، در نتیجه حل کردن پودر صمغ در آب دیونیزه با استفاده از همزن مگنت‌دار به مدت ۲ ساعت و آب‌گیری کامل آن در دمای یخچالی به مدت ۱۸ ساعت تهیه شد. پس از آن، پراکنش حاصل در 10000 g به مدت ۱ ساعت، در دمای 35°C سانتریفوژ شد و فاز رویی منجمد و سپس با استفاده از دستگاه خشک کن انجمادی 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 هم‌زدن آرام، به مدت ۲ ساعت در دمای محیط تهیه شدند. سپس برای اطمینان از آب‌گیری کامل پلیمرها به مدت ۱۸ ساعت در دمای یخچالی نگهداری شدند. شایان ذکر است برای جلوگیری از رشد میکروبی ۰/۰۲ درصد وزنی سدیم آزید به نمونه‌ها اضافه شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده ها: تمامی آزمون ها با حداقل سه تکرار انجام شد. آنالیز آماری یافته ها برحسب لزوم به روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) یا Independent-Samples T-Test، با استفاده از نرم افزار SPSS₁₄ صورت گرفت. تست دانکن در سطح احتمال ۵٪ برای تجزیه و تحلیل میانگین ها به کار رفت.

• یافته ها

طیف سنجی نور مرئی: کدورت یک پراکنش تحت تأثیر مقدار، وزن ملکولی، اندازه، شکل و دیگر ویژگی های نوری ذرات موجود در پراکنش است. اندازه گیری کدورت متناظر با اسیدی کردن نمونه، به عنوان یک روش ساده و مینا، برای پایش فرایند توده ای شدن مرکب به طور گسترده استفاده شده است (۱، ۲). از این رو، در ابتدا رفتار کلوئیدی سامانه با استفاده از روش طیف سنجی مورد بررسی قرار گرفت.

شکل ۱ پایش جذب سامانه های دوگانه و سه گانه ی مورد مطالعه را در pH=۶-۲ نشان می دهد. مقادیر جذب نمونه های 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 میان کنش این دو پلیمر استنباط می شود. 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 کمپلکس های درون پلیمری است. پس از این گذار، از pH = ۴/۸۵ مقادیر جذب به طور چشمگیری افزایش پیدا کرد که می تواند ناشی از هم انبوهی 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 ماکروسکوپی قابل مشاهده بود. پس از آن متناظر با کاهش pH مقادیر جذب کاهش پیدا کرد. سرانجام، درحالی که pH=۲/۵۰ مقدار جذب بسیار ناچیز شد و توده ای شدن مرکب به طور کامل بازداشته شد. این pH پایین تر از pK_a صمغ است.

تکنیک تفرق نور لیزر با استفاده از دستگاه Cilas particle size analyzer 1090، فرانسه، با به کارگیری نور لیزر هلیوم-نئون (طول موج ۶۳۵ نانومتر) انجام شد. نتایج در قالب شاخص های $D_{0.1}$ ، $D_{0.5}$ ، $D_{0.9}$ و $D[4,3]$ گزارش شده است. $D_{0.1}$ ، $D_{0.5}$ و $D_{0.9}$ به ترتیب نمایانگر ۱۰٪، ۵۰٪ و ۹۰٪ 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 می شود:

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

آزمون های رئولوژیک: کلیه ی آزمون ها با استفاده از دستگاه رئومتر چرخشی (Anton paar ، physica MCR 301) ، اتریش) انجام شد. رئومتری مورد استفاده، رئومتری استوانه ای هم محور (Concentric cylinder) با نسبت شعاعی ۱/۰۸۴۶ بود. برای تنظیم دمای سامانه از Peltier plate با حساسیت ± 0.1 مجهز به سیرکولاتور آب استفاده شد. برای جلوگیری از تبخیر حلال، نمونه ها در طول آزمایش با تله ی حلال (Solvent trap) پوشانده شدند. پایش ویسکوزیته ی سامانه تابع زمان در نرخ برش ثابت ۵ بر ثانیه و دمای 22°C صورت گرفت. به طور موازی، پایش pH سامانه تابع زمان انجام شد. تشریح این روش در جای دیگری آورده شده است (۱۹).

تعیین pH های کلیدی، مبین گذارهای بحرانی سامانه: مجموعه از pH های کلیدی، مبین گذارهای بحرانی سامانه در جریان میان کنش دو پلیمر به صورت گرافیکی به عنوان نقطه ی تلاقی دو خط مماس بر منحنی (محل تغییر شیب) در هر روش آزمون تعیین شد:

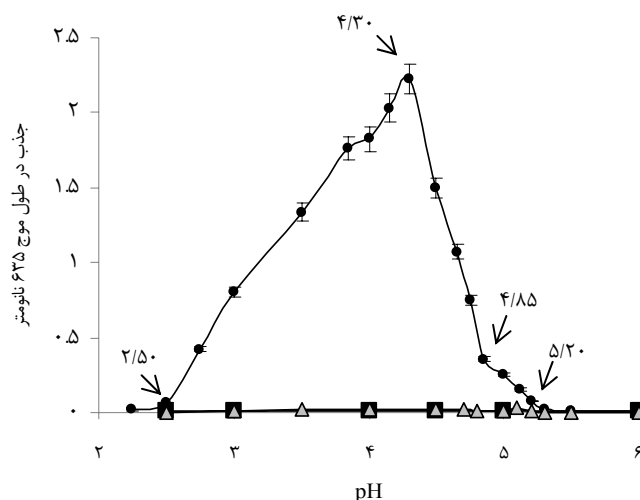
$pH_{\text{Soluble Complexes}}$: متناظر با تشکیل کمپلکس های محلول
 $pH_{\text{Complex Aggregation}}$: متناظر با هم انبوهی کمپلکس های درون پلیمری و تشکیل کمپلکس های میان پلیمری
 $pH_{\text{Phase Separation}}$: متناظر با انجام جدایش فازی
 $pH_{\text{Coacervation}}$: متناظر با pH بهینه ی میان کنش (تشکیل کواسرویت ها)

$pH_{\text{Complex Suppression}}$: متناظر با بازداشت میان کنش

همان طور که در شکل ۲ مشاهده می شود، سامانه‌ی به دست آمده در $pH=5/00$ کدورتی اندک و ثابت در طول زمان نشان می دهد که بیانگر پایداری کامل کمپلکس های محلول موجود در سامانه، در نتیجه‌ی مقادیر بالای بار منفی آنها است. در $pH=4/50$ مقادیر جذب تابع زمان، تغییر معنی داری نداشتند که باز هم نشانی از پایداری سامانه در محدوده‌ی زمانی انتخابی است. به نظر می رسد که بار منفی باقی مانده‌ی روی کمپلکس ها از پیشرفت سریع هم‌انبوهی بیشتر کمپلکس های بین پلیمری و در نتیجه، ناپایداری سامانه جلوگیری می کند. رفتار سینتیک سامانه در $pH=4/30$ حالتی حد واسط داشت. پس از یک دوره ثابت نسبی، مقادیر 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 ته نشینی برخی از کمپلکس ها می تواند توجیه کننده‌ی این نکته باشد. هنگامی که pH به مقادیر پایین تر کاهش پیدا کرد، پروفایل جذب به وضوح گذارهای قابل مشاهده‌ای را تابع زمان نشان داد. در $pH=4/15$ 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 ماکروسکوپی، پراکنش مخلوط به شدت ناپایدار بود و یک جدایش فازی بسیار سریع دیده شد. این سینتیک سریع پیشنهاد می کند که بار کمپلکس ها نزدیک به حالت خنثی بوده است. در $pH=3/00$ پروفایل جذب پراکنش مخلوط تقریباً از الگوی مشابه با حالت قبل پیروی کرد؛ البته سینتیک آرام تری دیده شد که این نکته می تواند ناشی از عدم کفایت خنثی شدن بار ساختارهای تشکیل شده و وجود دافعه الکترواستاتیک میان آنها باشد.

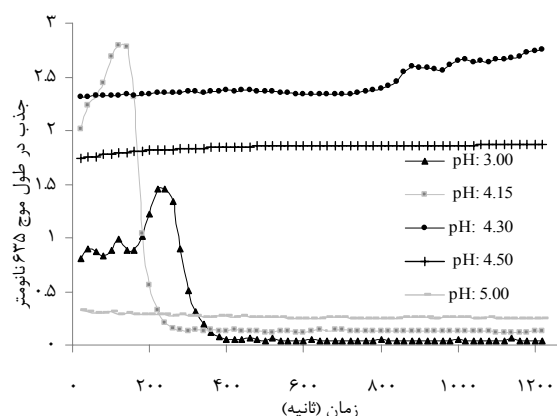
توزیع اندازه‌ی ذرات کمپلکس و کواسرویت در سامانه: برای دستیابی به اطلاعات بیشتر در ارتباط با فرایند توده‌ای شدن مرکب میان بتالاکتوگلوبولین و تراگانانتین، آنالیز اندازه ذرات برای پراکنش مخلوط در pH های مختلف انجام شد.

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، $D[4,3]$ کمپلکس های تشکیل شده یک کاهش بسیار چشمگیر (۶۰٪) در محدوده‌ی pH ۴/۳۰-۴/۵۰



شکل ۱. پایش جذب تابع pH برای (●): سامانه‌ی بتالاکتوگلوبولین و تراگانانتین (غلظت کل پلیمر ۳/۰ درصد وزنی و نسبت پروتئین به پلی ساکارید ۲ به ۱)، (▲): محلول بتالاکتوگلوبولین (۲/۰ درصد وزنی)، (■): محلول تراگانانتین (۱/۰ درصد وزنی). خطوط برای هدایت چشم هستند و فلش ها مبین pH های کلیدی. خطاهای اندازه گیری 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 مقیاس های زمانی مختلف نیز می تواند رخ دهد و پایداری سامانه های حاوی ذرات کمپلکس یا کواسرویت را تحت تأثیر قرار دهد. از این رو، پروفایل جذب سامانه‌ی بتالاکتوگلوبولین و تراگانانتین تابع زمان در چند pH مشخص بررسی شد.



شکل ۲. پروفایل وابسته به زمان جذب در pH های مشخص برای سامانه‌ی بتالاکتوگلوبولین و تراگانانتین (غلظت کل پلیمر ۳/۰ درصد وزنی و نسبت پروتئین به پلی ساکارید ۲ به ۱). خطوط برای هدایت چشم هستند. حداکثر انحراف استاندارد در میزان جذب ۳٪ بود.

۱/۰۶، ۱/۲۸، ۱/۷۴ میکرون، و در $pH=4/15$ بسیار کوچک‌تر و به ترتیب ۱۰، 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 آگیری (۵). بدیهی است ویژگی‌های ذره‌ای یک پراکنش پروتئین-پلی ساکارید در طول پدیده‌ی جدایش فازی تجمعی، متحمل تغییرات چشمگیری می‌شود. از این رو، بر آن شدیم تا از روش رئومتری در جریان اسیدی کردن آرام سامانه‌ی بتالاکتوگلوبولین و تراگانانتین، برای پایش چگونگی گذارهای ساختاری سامانه، در طول فرایند کمپلکس شدن استفاده کنیم.

نشان داد و به بیان دقیق‌تر به حداقل مقدار خود در $pH=4/30$ 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، پهنای توزیع اندازه ذرات در $pH=4/30$ 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 ۵/۲۰ و ۴/۱۵ بر اساس تعداد (On a number basis) با استفاده از نرم‌افزار دستگاه محاسبه شد. مقادیر $D_{0.1}$ ، $D_{0.5}$ و $D_{0.9}$ در pH ۵/۲۰ به ترتیب برابر با

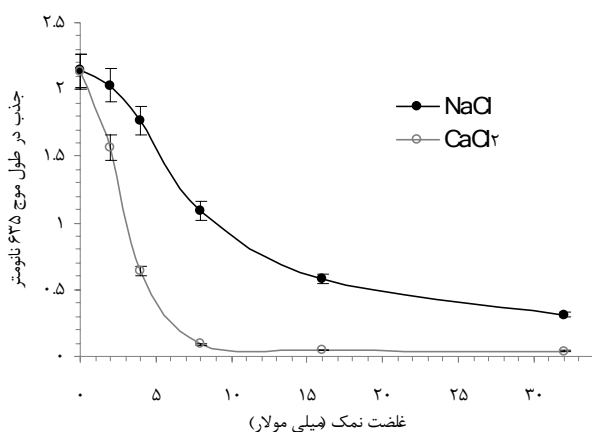
جدول ۱. داده‌های مربوط به توزیع اندازه‌ی ذرات سامانه (بر اساس حجم) بتالاکتوگلوبولین - تراگانانتین، در pH های مشخص (غلظت کل پلیمر ۰/۳ درصد وزنی و نسبت پروتئین به پلی ساکارید ۲ به ۱) *

pH	توزیع اندازه ذرات (μm)			
	$D_{0.1}$	$D_{0.5}$	$D_{0.9}$	D [4,3]
۵/۲۰	$36/25 \pm 1/81^e$	$105/65 \pm 5/28^h$	$256/28 \pm 12/50^h$	$129/91 \pm 5/19^h$
۴/۸۵	$32/53 \pm 1/30^d$	$92/60 \pm 2/07^g$	$224/49 \pm 8/97^g$	$113/35 \pm 4/50^g$
۴/۵۰	$13/53 \pm 0/55^{bc}$	$56/65 \pm 2/26^f$	$165/48 \pm 3/30^f$	$74/95 \pm 2/90^{ef}$
۴/۳۰	$9/09 \pm 0/36^a$	$24/49 \pm 0/97^a$	$72/73 \pm 2/87^b$	$30/60 \pm 1/22^a$
۴/۱۵	$11/22 \pm 0/45^{ab}$	$32/30 \pm 1/20^b$	$62/92 \pm 2/51^a$	$44/16 \pm 1/32^b$
۴/۰۰	$13/53 \pm 0/54^{bc}$	$41/25 \pm 1/23^c$	$97/68 \pm 3/90^c$	$50/75 \pm 3/80^c$
۳/۸۵	$14/39 \pm 0/57^c$	$49/21 \pm 1/96^d$	$115/12 \pm 4/06^d$	$59/28 \pm 2/37^d$
۳/۵۰	$15/44 \pm 0/61^c$	$52/44 \pm 1/57^e$	$157/09 \pm 4/71^e$	$71/29 \pm 2/12^e$
۳/۰۰	$14/45 \pm 0/56^c$	$57/10 \pm 2/28^f$	$168/97 \pm 6/75^f$	$75/85 \pm 3/79^f$

* میانگین‌هایی که در هر ستون با حروف انگلیسی متفاوت نشان‌دار شده‌اند، به طور معنی‌دار با یکدیگر متفاوت هستند ($p < 0/05$).

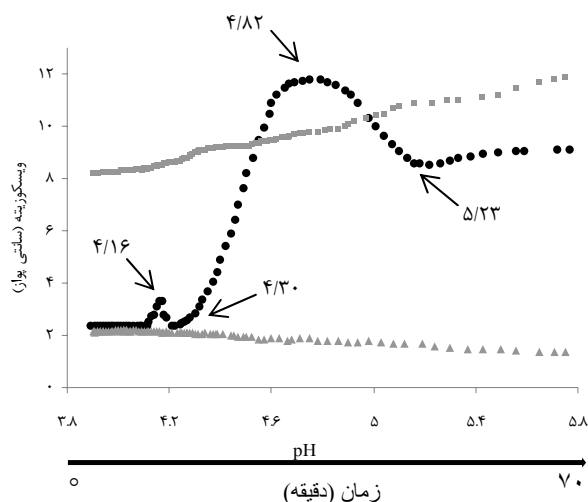
pH=۴/۳۰ به طور قابل توجهی کاهش یافت. در انتهای طیف مکانیکی، به طور غیرقابل انتظاری، یک قله (Peak) جدید در حوالی pH=۴/۱۵ مشاهده شد.

اثر نمک بر میزان میان کنش در pH تشکیل ذرات کواسرویت: پدیده جدایش فازی تجمع با توجه به ماهیت الکترواستاتیک خود به شدت تحت تأثیر قدرت یونی سامانه، از طریق تأثیر آن بر دانسیته‌ی 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 مرکب میان بتالاکتوگلوبولین و تراگاکانتین است - در pH بهینه میان کنش 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 ۰/۳ درصد وزنی و نسبت پروتئین به پلی ساکارید ۲ به ۱). خطوط برای هدایت چشم هستند.

شکل ۴ اثر قوی حضور میکروبیون‌ها را بر کاهش میزان میان کنش ماکروبیون‌های موجود در سامانه به وضوح، نشان می‌دهد. متناظر با افزایش غلظت نمک، کلرید کلسیم در مقایسه با کلرید سدیم با شیب بیشتری کدورت سامانه را کاهش داد، به طوری که در غلظت ۸ میلی‌مولار میان کنش 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 ۰/۳ درصد وزنی و نسبت پروتئین به پلی ساکارید ۲ به ۱)، (▲): محلول بتالاکتوگلوبولین (غلظت پلیمر ۰/۲ درصد وزنی)، (■): محلول تراگاکانتین (غلظت پلیمر ۰/۳ درصد وزنی). فلش‌های مورب مبین pH های کلیدی و فلش افقی مبین مقیاس زمانی است. حداکثر خطای اندازه‌گیری در تعیین pH های کلیدی ۰/۵ درصد و در مقدار ویسکوزیته‌ی گزارش شده در این pH ها ۰/۳ درصد بود.

شکل ۳ پایش ویسکوزیته‌ی 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 نتیجه‌ی 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 ویسکوزیته‌ی سامانه، از pH=۵/۲۳ مقادیر 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، ویسکوزیته‌ی مخلوط تا رسیدن به

• بحث

تعیین pH های کلیدی، مبین گذارهای بحرانی سامانه در جریان جدایش فازی تجمعی بتالاکتوگلوبولین و تراگاکانتین: به دنبال آنالیز نتایج حاصل از سه تکنیک تکمیل کننده (طیف سنجی نور مرئی، تفرق نور لیزر و رئولوژی) رفتار کلئیدی سامانه با تعیین pH های کلیدی که مبین گذارهای کلیدی در جریان میان کنش دو پلیمر است، پایش شد. در ادامه، روند فرایند جدایش فازی تجمعی و تشکیل گونه های مختلف ذرات بیوپلیمری در غالب پنج ناحیه ی محدود شده با pH مورد بحث قرار خواهد گرفت.

$pH=5/20-6/00$: در این محدوده، مقادیر جذب اندک و ثابت، و ویسکوزیته سامانه بدون تغییر بود. این امر نشان از حضور دو پلیمر در حالت هم-محلولی (Co-solubility) دارد. در این حالت، ملکول های بتالاکتوگلوبولین که در pH ی بالاتر از pH ایزوالکتریک خود (5/15) قرار دارند، و نیز ملکول های تراگاکانتین بار خالص منفی دارند؛ از این رو، برآیند واکنش آن ها از نوع دافعه است.

$pH=4/85-5/20$: از حدود $pH=5/20$ پارامترهای ثبت شده (جذب و ویسکوزیته) به طور معنی داری شروع به افزایش کردند. این امر تشکیل کمپلکس های محلول و درون پلیمری را در pH ی بالاتر از pH ایزوالکتریک بتالاکتوگلوبولین آشکار می کند. در توافق با این مشاهده گزارش شده است که این پروتئین در نتیجه ی دارا بودن نواحی با بار مثبت (Positive patches) در سطح ملکول خود (روی پپتیدهای ۱-۱۴، ۴۱-۶۰، ۷۶-۸۳ و ۱۳۲-۱۴۸) می تواند با یک پلی آنیون به صورت مکانی در pH هایی برابر یا کمی بالاتر از pH ایزوالکتریک خود وارد میان کنش شود (۲۲، ۸). همان طور که پیش از این بیان شد، از $pH=5/23$ مقدار ویسکوزیته متناظر با زمان اسیدی شدن شروع به افزایش کرد؛ تا آن جا که به حداکثر مقدار خود در $pH=4/82$ رسید. این محدوده از pH متناظر با تشکیل و توسعه ی کمپلکس های محلول است. چنین کمپلکس هایی که به شدت هیدراته هستند، از زنجیره های منفرد پلی-ساکارید تشکیل شده اند که با تعداد کمی ملکول پروتئین اتصال دارند (۳). در تشکیل این ساختارهای مرکب علاوه بر نیروهای الکترواستاتیک، پیوندهای هیدروژنی (میان گروه های استری تراگاکانتین و گروه های هیدروکسیل، آمید و کربوکسیل بتالاکتوگلوبولین) نیز ممکن است نقش داشته باشند؛ همانطور که Girard و همکاران (۲۰۰۲) برای

سامانه ای حاوی بتالاکتوگلوبولین و پکتین گزارش کرده اند (۸). در این محدوده ی pH، کاهش اندازه ی ذرات اندک بود و به نظر می رسد سازمان یابی دوباره ی حلال و منظم شدن ملکول های آب در سطح کمپلکس (۲۳) مسئول افزایش ویسکوزیته سامانه است. برخلاف این مشاهده، گزارش شده است که ویسکوزیته ی مخلوط بتالاکتوگلوبولین و EPS B40 در pH تشکیل کمپلکس های محلول کاهش یافت (۲۴). این نتیجه ی مخالف می تواند ناشی از پاسخ نرم شونده با برش (Shear thinning) نمونه باشد که به وسیله ی ویسکومتر موئین (Capillary viscometer Ubbelohde) ایجاد شده است. به طور کلی، این ویسکومتر در گروه ویسکومترهای با نرخ برش بالا طبقه بندی می شود (۲۵). به طور مشابه، هنگامی که ما آزمون ها را در نرخ برش $s^{-1} 85$ انجام دادیم، افزایش در ویسکوزیته مشاهده نشد (نتایج نشان داده نشده است).

$pH=4/30-4/85$: دومین گذار در میزان جذب سامانه در $pH=4/85$ دیده شد. به نظر می رسد هم انبوهی کمپلکس های درون پلیمری از این pH آغاز می شود. به بیان دیگر، از آن جا که دانسیته بار ملکول های بتالاکتوگلوبولین به موازات کاهش pH افزایش پیدا می کند، پروتئین های کمپلکس شده می توانند با واحدهای تراگاکانتین که در کمپلکس های دیگر حضور دارند نیز، وارد میان کنش شوند. هم چنان که این فرایند در مطالعات پیشین نیز مطرح شده است (۲۶، ۶). حداکثر مقدار جذب در $pH=4/30$ دیده شد که مبین حداکثر تعداد واحدهای ساختاری کمپلکس شده است. شایان ذکر است که در این pH، ناپایداری ملایم سامانه و انجام جدایش فازی قابل مشاهده بود. اگرچه جدایش فازی به طور کلی ناشی از نامحلول شدن کمپلکس های هم انبوه شده است، اما توجه به این نکته ضروری است که در سامانه های پروتئین-پلی آنیونی شرکت-پذیر (Associative)، جداسازی بدون نیاز به خنثی بودن کمپلکس ها هم می تواند رخ دهد و تحت کنترل یک نسبت بحرانی اندازه به بار قرار دارد (۲۶، ۲۲۷). این یافته که در محدوده ی pH پیش گفته، مقادیر جذب افزایش پیدا کرد، در حالی که اندازه ی ذرات به طور قابل توجهی کاهش یافت، می تواند تشکیل تعداد بسیار زیادی ساختارهای کوچک کمپلکس شده را نشان دهد.

محیط نسبت داد، این موضوع در ابتدا ناشی از هم‌جوشی واحدهای ساختاری است. در pHهای پایین‌تر، کمپلکس‌ها دوباره به سوی محلول شدن پیش می‌روند و سرانجام در حوالی $pH=2/50$ 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 گسترده خود باز می‌گردند و میانگین حجمی قطر ساختارهای تشکیل شده به تدریج افزایش پیدا می‌کند.

اثر نمک بر میزان میان‌کنش در pH تشکیل ذرات کواسرویت: متناظر با افزایش غلظت نمک، مقادیر جذب سامانه بتالاکتوگلوبولین- تراگاکانتین کاهش یافت. این مشاهده حاکی از اثر قوی نمک بر تشکیل کمپلکس و تأییدی بر ماهیت الکترواستاتیک میان‌کنش این دو پلیمر است. این یافته در توافق با پژوهش‌های پیشین است که بیان می‌کند حضور نمک باعث تضعیف پدیده‌ی توده‌ای شدن مرکب می‌شود و کمپلکس‌های حاصل ساختاری هتروژن و آبیکی خواهند داشت؛ حتی در حضور غلظت‌های بالای نمک، تشکیل کمپلکس به طور کامل متوقف می‌شود (۲۴، ۳۲). افزایش غلظت نمک باعث کاهش مؤثر طول دبی (Debye Length) و کمتر شدن آن در مقایسه با میانگین فاصله‌ی نقاط (Site) مثبت پروتئین و نقاط منفی پلی ساکارید می‌شود. در نتیجه، بار سطحی پلیمرها توسط میکروبیون‌های موجود در سامانه پوشیده می‌شود (۲۱، ۳۳). در چنین شرایطی پروتئین و پلی ساکارید بار لازم برای شرکت در میان‌کنش 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 میان‌کنش بتالاکتوگلوبولین و تراگاکانتین شد.

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

روند مشاهده شده می‌تواند به افزایش جرم مولی ذرات تشکیل شده نیز نسبت داده شود. در این محدوده‌ی pH، ویسکوزیته‌ی سامانه به شدت کاهش پیدا کرد. همان‌طور که قبلاً بحث شد، کمپلکس‌های اولیه از حوالی $pH=4/80$ نوعی هم‌انبوهی 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 فشردن 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 معنی‌داری 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 (۲۹-۳۱).

$pH=4/15-4/30$: در این محدوده، مقدار جذب اندکی کاهش یافت و در $pH=4/15$ پروفایل جذب سامانه تابع زمان جدایش فازی بسیار سریعی را نشان داد. این سینتیک سریع پیشنهاد می‌کند که بار کمپلکس‌ها نزدیک به حالت خنثی است و توده‌ای شدن مرکب رخ داده است. از سوی دیگر، میانگین حجمی قطر ساختارهای تشکیل شده در مقایسه با $pH=4/30$ کمی افزایش یافت و توزیع اندازه‌ی ذرات نیز هموژن‌تر شد، این موضوع مبین ظهور جمعیت جدیدی از ذرات در نتیجه انجام توده‌ای شدن مرکب است. شایان ذکر است توزیع اندازه ذرات بر اساس تعداد در pH پیش گفته حاکی از حضور تعداد بسیار زیادی نانو ذرات بیوپلیمری مرکب در محیط است. همان‌طور که پیش از این اشاره شد، در انتهای طیف مکانیکی سامانه، به طور غیرقابل انتظاری، یک پیک جدید در حوالی $pH=4/15$ 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 شرکت‌پذیر باشد. افزایش اندازه‌ی ذرات سامانه و نیز هموژن بودن آن‌ها می‌تواند توضیح دیگری برای این پدیده باشد.

$pH=2/50-4/15$: کاهش میزان جذب سامانه در این محدوده‌ی 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 کمپلکس های بتا-لاکتوگلوبولین و صمغ کتیرا تراویده از گون گونه های آسترگالوس گوسیپینوس و آسترگالوس فلوکوسوس" است، و با حمایت مالی انستیتو تحقیقات تغذیه و صنایع غذایی انجام شد. به این وسیله از حمایت های مالی گروه تحقیقات صنایع غذایی و مرکز استعدادهای درخشان دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تشکر و قدردانی می شود.

پروبیوتیک ها به کار گرفته شوند. این ذرات ممکن است به دنبال تغییر pH یا قدرت یونی محیط نهایی دستخوش جدایش شوند که در برخی موارد می تواند به عنوان یک محدودیت مطرح شود. اما رویکردهایی مانند تیمار حرارتی برای رویارویی با این محدودیت وجود دارد. این مطالعه می تواند به عنوان پایه ای برای پژوهش های بعدی در راستای دستیابی به میکرو و نانو ذرات بیوپلیمری 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;167(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.
- Azarikia 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, Jasniowski 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, Batıgün 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