

نانوکمپلکس‌های صمغ عربی- کازئینات حامل بتا کاروتن (۲): بررسی اندازه ذرات، پتانسیل زتا، مورفولوژی و کارایی انکپسولاسیون

معصومه اکرمی^۱، بابک قنبرزاده^{۲*}، فرزانه پورظفر^۳، علی مرتضوی^۴ رسول دیناروند^۵ و جلال دهقان نیا^۶

تاریخ دریافت: ۹۴/۸/۳ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۰/۱۳

^۱ دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه تبریز

^۲ به ترتیب استاد و دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه تبریز

^۳ دانشجوی دکتری گروه صنایع غذایی دانشگاه آزاد سبزوار

^۴ دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

^۵ استاد دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران

*مسئول مکاتبه: Email: Ghanbarzadeh@tabrizu.ac.ir

چکیده

در این تحقیق، ویژگی‌های نانوکمپلکس‌های بر پایه صمغ عربی-کازئینات سدیم (تولید شده به روش هم‌تافتی) و کارایی انکپسولاسیون بتا کاروتن توسط این سیستم‌ها مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور، ابتدا محلول‌های کازئینات سدیم (در دو غلظت ۰/۱ و ۰/۵٪ وزنی-حجمی) و صمغ عربی (در سه غلظت ۰، ۰/۱، ۰/۵ و ۱٪ وزنی-حجمی) تهیه شدند و سپس بتاکاروتن در محلول‌های کازئینات سدیم بارگذاری شده و محلول‌های صمغ عربی به آنها اضافه گردیدند و با تنظیم pH، کمپلکس‌های محلول تولید شد. نتایج نشان داد که اندازه ذرات و پتانسیل زتا تحت تأثیر نسبت دو بیوپلیمر و pH قرار دارند. کمترین اندازه ذرات (۹۵ نانومتر) در غلظت ۰/۱٪ کازئینات و ۰/۵٪ صمغ عربی و در pH ۴/۵ به دست آمد در حالی که حداکثر پتانسیل زتا (۲۲- میلی ولت)، در نمونه ۰/۱٪ کازئینات-۰/۱٪ صمغ عربی و در pH ۵ مشاهده گردید. مطابق تصاویر به دست آمده از میکروسکوپی الکترونی پویشی (SEM)، نانوکمپلکس‌های ۰/۱٪ کازئینات - ۰/۵٪ صمغ عربی در pH ۴/۵، دارای اندازه ذرات در حدود ۱۰۰-۲۰۰ نانومتر بودند و همچنین در تصاویر به دست آمده از میکروسکوپی الکترونی عبوری (TEM)، نانوذراتی با هسته مشخص و دیواره دو لایه مشاهده شد. نتایج کارایی انکپسولاسیون نشان داد که افزایش غلظت کازئینات و صمغ عربی به ترتیب موجب افزایش و کاهش راندمان گردید.

واژگان کلیدی: انکپسولاسیون، کمپلکس کازئین - صمغ عربی، بتا کاروتن، پتانسیل زتا، میکروسکوپی الکترونی

^۱ این مقاله با کد ۹۳۰۰۶ به تاریخ ۹۳/۳/۱۹ در نشریه "پژوهش‌های صنعت غذا" دانشگاه ارومیه مورد پذیرش واقع شده بود، به علت انحلال مجله مذکور به این نشریه ارسال و پس از بررسی اجمالی مجدداً در تاریخ فوق مورد پذیرش قرار گرفت.

مقدمه

بتاکاروتن، یکی از مهمترین رنگدانه های گیاهی و از دسته کاروتنوئیدهاست و هر واحد آن از ۸ واحد ایزوپرن تشکیل شده است (سیلوا و همکاران ۲۰۱۱). در دیواره روده کوچک، هر واحد بتاکاروتن توسط آنزیم ۱۵و۱۵ دی اکسیژناژ به دو واحد ویتامین A تبدیل می شود (دزوبری ۱۹۹۸). بتاکاروتن یک آنتی اکسیدان قوی در بدن شناخته می شود و خاصیت آنتی اکسیدانی آن به دلیل جلوگیری از تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن است و عملکردی مستقل از ویتامین A دارد (سوتر و همکاران ۲۰۰۷). بدن انسان، قادر به ساخت بتاکاروتن نیست و به منابع خارجی آن نیاز دارد. در سالهای اخیر، انکپسولاسیون اجزای غذایی و زیست فعال به علت مزایای مختلف آن گسترش یافته است که مهمترین این مزایا عبارتند از حفاظت در برابر عوامل محیطی (نور، حرارت، اکسیژن، فلزات سنگین، آنزیم ها)، پخش ترکیبات آگریز در محیطهای آبی، کنترل رهایش و انتشار مواد زیست فعال در مواد غذایی، بهبود جذب در سیستم گوارشی و پوشاندن بو و طعم نامطلوب مواد (فانگ و همکاران ۲۰۱۰؛ چن و همکاران ۲۰۱۰؛ زویدان و همکاران ۲۰۱۰).

در نانوانکپسولاسیون حداقل یکی از ابعاد حاملها بایستی کمتر از ۱۰۰ نانومتر می باشد (در برخی از منابع زیر ۵۰۰ نانومتر ذکر شده است). کاهش ابعاد از مقیاس میکرو به نانو موجب افزایش زیست دسترسی، حلالیت و شفافیت محلولها می گردد (چائودری و همکاران ۲۰۰۷). نانوکپسولها را می توان بر اساس ماهیت ترکیب کپسولها به دودسته بیوپلیمری (پروتئینی، پلی ساکاریدی و کمپلکس پروتئین-پلی ساکارید) و بر پایه لیپید (لیپوزوم، نیوزوم، فیتوزوم، نانوامولسیون، میکروامولسیون، ذرات لیپیدی جامد و لیپیدهای نانساختار) تقسیم کرد.

انواع مختلفی از پروتئین‌ها و پلی ساکاریدها به تنهایی یا بصورت کمپلکس می توانند برای تولید نانو حامل‌های

بیوپلیمری بکار روند (چن و همکاران ۲۰۰۶؛ جونز و همکاران ۲۰۱۰ و ۲۰۱۱؛ ماتالانیس و همکاران ۲۰۱۱؛ زوئیدام و همکاران ۲۰۱۰).

دکروئیف و همکاران (۲۰۰۳) نشان دادند که نانوکپسول‌های تولید شده از میسل کازئینی، می‌توانند به عنوان نانو حامل‌هایی برای حفاظت و انتقال کلسیم، فسفات و همچنین مواد مغذی آگریز حساس، در محصولات غذایی به کار روند. هوگان و همکاران (۲۰۰۱) عنوان کردند که کازئینات‌ها، ترکیباتی هستند که می‌توانند به منظور ریزپوشانی مواد مختلف مغذی و دارویی به کار روند و این پروتئین هر چند در صورت استفاده به عنوان کپسول، ساختار میسلی خود را همانند بسیاری دیگر از رفتارهای عملکردی از دست می‌دهد؛ اما با برهمکنش‌های آگریز و ایجاد پل کلسیم فسفات به سرین فسفات به شکل میسل در می‌آید.

در سالهای اخیر، پژوهش‌های متعددی روی ویژگیهای نانوحامل‌های بر پایه کمپلکس‌های پلی ساکارید-پروتئین، انجام شده است: کاراگینان-کازئینات-ویتامین D خوش منظر و همکاران (۱۳۹۲)؛ پکتین-کازئینات-امگا ۳ بحرانی و همکاران، (۱۳۹۲)؛ ژلان-کازئینات-امگا ۳ انباری و همکاران، (۱۳۹۲)؛ صمغ عربی-کازئینات (بی و همکاران، ۲۰۰۶)؛ کیتوزان-کازئینات (آنال و همکاران ۲۰۰۸)؛ کیتوزان-ژئین-توکوفرول (لئو و همکاران ۲۰۱۱)؛ پکتین-بتا لاکتوگلوبولین (کاناستو و همکاران ۲۰۰۹؛ جونز و همکاران ۲۰۱۰، رون و همکاران ۲۰۱۰؛ زیمت و لیونی ۲۰۰۹).

نانوحامل‌های بر پایه کمپلکس‌های پلی ساکارید-پروتئین، نسبت به نانوحامل‌های پروتئینی، دارای ویژگی‌های فیزیکی و حفاظتی بهتری هستند چون حضور پلی ساکاریدهای آنیونی در لایه بیرونی، موجب می‌شود که به علت تولید نیروی دافعه منفی بالاتر در pHهای مختلف، پایداری سیستم بیشتر شده و از لخته شدن و بزرگ شدن اندازه ذرات و در نتیجه رسوب جلوگیری شود و همچنین ماده فعال درونی (هسته)

کروماتوگرافی HPLC (شرکت Knauer مدل Smartline، ساخت آلمان) طی این پروژه استفاده گردید.

تهیه محلولهای کازئینات سدیم

جهت تهیه محلول های کازئینات سدیم (در دو غلظت ۰/۱ و ۰/۵ درصد)، پودر کازئینات توزین و داخل ۲۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه حل گردیده و حدود ۲۰ دقیقه در داخل سونیکاتور قرار داده شد. پس از حل شدن پودر و به دست آمدن محلول های شفاف، به مدت ۵ ساعت روی همزن مغناطیسی، در دور متوسط، هم زده شدند. نمونه های تهیه شده، برای آگیری بهتر، به مدت یک شبانه روز در یخچال نگهداری شدند (Ye et al. 2006).

تهیه محلولهای صمغ عربی

محلول های صمغ عربی بر اساس پیش آزمونها در سه غلظت ۰/۱، ۰/۵ و ۱ درصد تهیه شدند. برای این منظور، پودر صمغ عربی توزین و در آب دیونیزه حل گردید و سپس در سونیکاتور قرار داده شدند تا محلول ها بصورت شفاف در آیند و سپس به مدت ۵ ساعت روی همزن مغناطیسی به هم زده شدند. محلولهای آماده شده، به مدت یک شبانه روز در یخچال نگهداری شد.

تهیه محلول بتاکاروتن

برای تهیه محلول بتاکاروتن (۰/۳٪)، پودر بتاکاروتن در یک ظرف تیره توزین و بعد با استفاده از محلول استون دی کلرومتان با نسبت ۴ (استون) به ۶ (دی کلرومتان) به حجم مورد نظر رسانده شد. محلول بتا کاروتن، داخل ظرف درب بسته (چون بتاکاروتن نسبت به نور و اکسیژن، بسیار حساس است) به مدت ۱ ساعت روی همزن مغناطیسی در دور متوسط هم زده شد تا ذرات بتاکاروتن بصورت کامل حل شود (سیلوا و همکاران ۲۰۱۱).

تهیه محلول کازئینات سدیم حاوی بتاکاروتن

محلول های کازئینات سدیم به مدت چند دقیقه روی همزن مغناطیسی، هم زده و سپس در دستگاه پروب

بهتر حفاظت گردد. یی و همکاران (۲۰۰۶) نشان دادند که کازئینات سدیم و صمغ عربی، کمپلکس هایی با اندازه ۱۰۰-۲۰۰ نانومتر تشکیل می دهند که پایداری بیشتری نسبت به ذرات کازئینی خالص دارند. جون زیائو و همکاران (۲۰۱۱) از کمپلکس صمغ عربی-ایزوله پروتئین سویا برای میکروانکپسولاسیون روغن پرتقال استفاده کردند. آنها اعلام کردند که که pH مناسب برای توده ای شدن این دو بیوپلیمر ۴ است و همچنین قدرت یونی بالا، میزان توده ای شدن دو بیوپلیمر را کاهش می دهد.

در این پژوهش، کمپلکس صمغ عربی-کازئینات از طریق کواسرویشن (تشکیل کمپلکس محلول) تولید شد و برای کپسوله کردن بتاکاروتن استفاده گردید و پارامترهای مختلف شامل اندازه ذرات، پتانسیل زتا، مورفولوژی و کارایی انکپسولاسیون بررسی گردید.

مواد و روشها

مواد

کازئینات سدیم ۹۹٪ (شرکت Sigma، نیوزلند)، صمغ عربی (شرکت Merck، آلمان) بتاکاروتن با درجه خلوص ۹۹٪ (شرکت Sigma-Aldrich، آمریکا)، سیترات سدیم، کلرید کلسیم، پیروفسفات پتاسیم، اتیلن، دی کلرومتان، EDTA، هپتان، اسیدکلریدریک، هیدروکسید سدیم، استون و همچنین استون نیتریل، متانول، تترا هیدرو فورانول (THF) با درجه خلوص HPLC (شرکت Merck آلمان) برای انجام این پروژه استفاده شدند.

از تجهیزات ترازوی آزمایشگاهی با دقت ۰/۰۰۰۱ و ۰/۰۱ گرم (شرکت Sartorius مدل CP1245، ساخت آلمان)، همزن مغناطیسی (شرکت Memmert مدل WB14، ساخت آلمان)، pH متر (شرکت Seven Multi، ساخت سوئیس)، دستگاه زتا سایزر (شرکت Malvern Zetasizer مدل ZS، ساخت انگلیس)، سانتریفیوژ (شرکت Sigma مدل 3k30، ساخت آلمان)،

تهیه نانوکمپلکس کازئینات سدیم - صمغ عربی حاوی بتاکاروتن

فرمولاسیون‌های مختلف در جدول ۱ ارائه شده‌اند. در چهار ویال شیشه‌ای، ۲۵ میلی لیتر محلول ۰/۱٪ و در چهار ویال دیگر ۲۵ میلی لیتر محلول ۰/۵٪ کازئینات سدیم - بتاکاروتن ریخته شد. سپس ۲۵ میلی لیتر محلول‌های صمغ عربی در سه غلظت ۰/۱، ۰/۵ و ۱

جدول ۱- فرمولاسیون‌های نمونه‌های کمپلکس مختلف

تیمار	غلظت کازئینات (درصد وزنی-وزنی)	غلظت صمغ عربی (درصد وزنی-وزنی)
a	۰/۱	۰/۱
b	۰/۱	۰/۵
c	۰/۱	۱
d	۰/۵	۰/۵

درصد، به روی محلول‌های کازئینات-بتاکاروتن اضافه گردید (برای غلظت صمغ عربی صفر٪ به هر کدام از دو غلظت محلول کازئینات، ۲۵ میلی لیتر آب دیونیزه اضافه شد). بنابراین ۸ نمونه (دو نمونه کازئینات و ۶ نمونه کمپلکس کازئینات-صمغ عربی) تولید شد. pH محلولها با استفاده از اسیدکلریدریک و هیدروکسید پتاسیم ۰/۱ نرمال، به تدریج به ۴/۸ رسانده شد. بعد از تنظیم pH، ویالها حدود ۵ دقیقه در سونیکاتور قرار داده شدند تا بر همکنش بین بیوپلیمرها و در نتیجه تشکیل کمپلکس، بهتر صورت گیرد (یی و همکاران ۲۰۰۶).

اندازه‌گیری اندازه ذرات

به منظور مطالعه اندازه ذرات، از دستگاه زتاسایزر (Malvern، انگلیس) استفاده شد. ابتدا سل دستگاه بوسیله آب دیونیزه شستشو داده و سپس نمونه با سرنگ، داخل سل تزریق شد. پس از تزریق نمونه، سل داخل محفظه مربوطه قرار گرفت و اندازه ذرات از دستگاه خوانده شد. این آزمون در سه مرحله زمانی انجام گرفت. در مرحله اول، سایز ذرات یک روز بعد از

سونیک قرار داده شدند. محلول بتاکاروتن بوسیله سرنگ با نسبت ۱ به ۹ (نسبت به محلول کازئینات سدیم) داخل محلول تزریق و بعد در دستگاه پروب سونیک فراصوت شد (۳ دقیقه) تا پخش ذرات بتاکاروتن، بهتر صورت گیرد. برای حذف حلال، محلول‌های کازئینات حاوی بتاکاروتن، داخل دستگاه روتاری اوپراسیون (دور rpm ۱۰۰، دمای °C ۴۰ درجه سانتیگراد و مدت زمان ۱ ساعت) قرار داده شدند (حدود ۱۰ دقیقه در ابتدای کار، میزان چرخش و درجه حرارت، بایستی خیلی کم باشد و به تدریج افزایش یابد چون احتمال کف کردن محلول‌ها در این مرحله زیاد می‌باشد). افزودن بافرها به محلول‌های کازئینات حاوی بتاکاروتن، روی هم زن به ترتیب انجام شد. در ابتدا ۰/۴ میلی لیتر تری سیترات سدیم به محلول کازئینات ۰/۱٪ و ۲ میلی لیتر به محلول کازئینات ۰/۵٪ اضافه گردید. با استفاده از سمپلر در طی ۸ مرحله و در طول ۱۵ دقیقه، پیروفسفات پتاسیم (۲/۴ میلی لیتر برای محلول کازئینات ۰/۱٪ و ۱۲ میلی لیتر به محلول کازئینات ۰/۵٪) و کلریدکلسیم (۲ میلی لیتر برای محلول کازئینات ۰/۱٪ و ۱۰ میلی لیتر برای محلول کازئینات ۰/۵٪) افزوده شدند. سپس pH محلول‌ها با استفاده از هیدروکسید پتاسیم و اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال، بین ۷-۶/۹ تنظیم شد. بعد از تنظیم pH محلول در محدوده خنثی، محلول‌ها با استفاده از آب دیونیزه، جهت رسیدن به غلظت‌های نهایی ۰/۱ و ۰/۵٪، به حجم رسانده شدند و سپس حدود نیم ساعت روی همزن مغناطیسی، هم زده شدند و در انتهای این مرحله، ۵۰۰ میلی لیتر محلول‌های کازئینات ۰/۱ و ۰/۵٪ حاوی بتاکاروتن تهیه شدند (سمو و همکاران ۲۰۰۷؛ سیلوا و همکاران ۲۰۱۱).

ارزیابی کارایی انکپسولاسیون

این ارزیابی در سه مرحله انجام شد: استخراج بتاکاروتن از نانوکمپلکس، آنالیز توسط HPLC و محاسبه کارایی انکپسولاسیون. جهت استخراج بتا کاروتن، ۷ میلی لیتر از نمونه آماده کرده، سانتریفیوژ گردید (با دور ۲۰۰۰rpm در مدت زمان ۳۰ دقیقه). سطح رویی جمع آوری شد و رسوب در ۵ میلی متر محلول EDTA ۱۰۰ میلی مولار نگهداری گردید (به مدت ۶ ساعت در دمای ۴ °C). سپس محلول روی همزن مغناطیسی به مدت ۱ ساعت هم زده شد و حدود ۱۵ دقیقه در سونیکاتور، فرا صوت گردید. در این مرحله محلول دو فازه گردید (یک فاز روغنی و یک فاز آبی) و فاز روغنی حاوی بتاکاروتن با استفاده از کیف دکانتور، جداسازی شد. برای جداسازی کامل بتاکاروتن از فاز آبی نیز، ۳۰ میلی لیتر هپتان در طی ۳ مرحله اضافه شد که هر مرحله شامل افزودن ۱۰ میلی لیتر هپتان به فاز آبی، هم زدن شدید و در نهایت جداسازی هپتان از فاز آبی با استفاده از دکانتور بود و در نهایت هپتان حاوی بتاکاروتن در دستگاه روتاری اوپراسیون قرار داده و تا تبخیر کامل هپتان، اوپراسیون ادامه یافت و پودر نارنجی رنگ بتاکاروتن باقی می ماند و این پودر در ۳ میلی لیتر فاز موبایل حل گردیده و به دستگاه HPLC تزریق شد.

به منظور تعیین میزان بتاکاروتن انکپسوله شده از دستگاه HPLC (Knaur Smartline، آلمان) با دکتور UV-VIS و ستون C18 استفاده شد. فاز متحرک متانول - استونیتریل - THF با نسبت ۲۰-۱۰-۷۰ تهیه و با سرعت جریان ۱ میلی لیتر در دقیقه وارد ستون گردید. در مرحله بعد پنج غلظت متفاوت از محلول بتاکاروتن آماده شد و به ستون تزریق گردید و در طول موج ۴۷۰ نانومتر پیک این ماده مشخص گردید. سپس با استفاده از نرم افزار اکسل و داده های به دست آمده، منحنی کالیبراسیون رسم گردید (سمو همکاران ۲۰۰۷؛ زو و همکاران ۲۰۱۰).

تولید اندازه گیری شد و نمونه هایی که رسوب دادند و اندازه آنها بالای یک میکرون گزارش شد، کنار گذاشته شد. مرحله دوم و سوم آزمون، ۳۰ و ۸۰ روز بعد از تولید بود که در این مرحله، نمونه های شفاف و بدون رسوب مرحله قبل به منظور ارزیابی پایداری فیزیکی، مورد آزمون قرار گرفتند. (بی و همکاران، ۲۰۰۶).

اندازه گیری پتانسیل زتا

برای تعیین پتانسیل زتای نانوکمپلکس ها، از دستگاه زتا سایزر (Malvern، انگلیس) استفاده شد. بدین منظور، ابتدا سل دستگاه، دوبار توسط آب دیونیزه شستشو داده و سپس نمونه بصورت مستقیم، توسط سرنگ داخل سل تزریق گردید و سل حاوی نمونه در محفظه مربوطه قرار داده شد و در نهایت پتانسیل زتا توسط دستگاه گزارش شد.

آزمون میکروسکوپی الکترونی پویشی (SEM)

برای مشاهده ساختار سطحی و برآورد اندازه نمونه ها از میکروسکوپ الکترونی پویشی (Philips مدل XL30، هلند) استفاده شد. سطح نمونه ها توسط لایه ای از طلا پوشانده شد و از ولتاژ ۳۰ کیلوولت برای حداکثر بزرگنمایی استفاده گردید.

آزمون میکروسکوپی الکترونی عبوری (TEM)

برای مشاهده ساختار درون نمونه ها، از میکروسکوپ الکترونی عبوری (Philips CM30، هلند) و از روش رنگ آمیزی منفی استفاده شد. در ابتدا یک قطره از سوسپانسیون حاوی نانوکمپلکس بر روی گرید مسی (۳/۰۵mm، HF 36، ساخت کشور استرالیا) با مش ۲۰۰ به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت. در ادامه برای رنگ آمیزی نانوکمپلکس ها یک قطره اورانیل استات ۲٪ به مدت ۳۰ ثانیه ریخته شد. گرید مسی با استفاده از کاغذ فیلتر خشک شد و برای آنالیز تصویر در دستگاه TEM قرار گرفت. از ولتاژ بالا حدود ۲۰۰ کیلو ولت برای وضوح تصویر استفاده شد.

همانطور که در شکل ۱-الف ملاحظه می‌شود حداقل اندازه ذرات در حداقل مقدار کازئینات سدیم یعنی ۰/۱٪ بدست می‌آید و با افزایش غلظت به ۰/۵٪، اندازه ذرات افزایش می‌یابد با افزایش غلظت صمغ عربی از ۰/۱ به ۰/۵ درصد، اندازه ذرات از ۱۳۹/۶۷ به ۹۵/۴۳ نانومتر کاهش و با افزایش دوباره صمغ از ۰/۵ به ۱٪، اندازه ذرات به صورت غیر معنی دار از ۹۵/۴۳ به ۱۱۵/۳۳ نانومتر افزایش یافت. احتمالاً در غلظت‌های پایین صمغ عربی، مقدار کافی پلی ساکارید با بار منفی، برای پوشاندن سطح کازئینات وجود ندارد بنابراین امکان تشکیل لخته از طریق انجام پدیده انبوهش ناشی از تشکیل پل^۱ و در نتیجه افزایش اندازه ذرات وجود دارد. در غلظت‌های کمی بالاتر (۰/۵٪ صمغ عربی)، به نظر می‌رسد سطح ذرات به خوبی توسط پلی ساکارید آنیونی پوشش می‌یابد و در اثر ایجاد نیروی دافعه منفی و ممانعت فضایی کافی، از انبوهش جلوگیری به عمل می‌آید. در غلظت‌های بالاتر صمغ (۱٪)، این امکان وجود دارد که علاوه بر ایجاد اتصالات بین کازئینات و صمغ عربی، بین زنجیرهای خود صمغ عربی نیز اتصال ایجاد گردد و شبکه ضعیفی از ژل تشکیل شود که قابلیت رویت نیست و اندازه ذرات را افزایش می‌دهد. هنگامی که غلظت کازئینات (از ۰/۱ به ۰/۵) افزایش می‌یابد، به نظر می‌رسد بار دیگر سطح ذرات، فاقد پلی ساکارید کافی برای ایجاد نیروی دافعه قوی خواهد بود و در نتیجه اندازه ذرات از ۹۵/۴۳ به ۲۷۷ نانومتر افزایش می‌یابد. مطابق کار بحرانی و همکاران (۱۳۹۲ a) روی نانوکمپلکس پکتین-کازئینات حاوی امگا سه، با افزایش غلظت کازئینات از ۰/۵٪ به ۱/۵٪ اندازه ذرات افزایش و با افزایش غلظت پکتین از ۰/۲٪ به ۰/۷٪ اندازه ذرات کوچکتر گردید و کمترین اندازه ذرات (۸۶ نانومتر) در غلظت ۱٪ کازئینات و ۰/۴۵٪ پکتین و در pH=۴/۱ مشاهده شد. در تحقیقی دیگر خوش منظر و همکاران (۱۳۹۲) طی کار روی نانوکمپلکس کاراگینان-

میزان کارایی انکپسولاسیون (EE) از معادله ۱ محاسبه شد:

$$EE = \frac{\text{مقدار بتا کاروتن آزاد} - \text{مقدار کل بتا کاروتن}}{\text{مقدار کل بتا کاروتن افزوده شده}} \times 100 \quad (1)$$

ارزیابی پایداری انکپسولاسیون

به منظور ارزیابی پایداری شیمیایی بتاکاروتن موجود در نانوکمپلکس‌ها، در اثر گذشت زمان، مقادیر بتا کاروتن به همان طریق گفته شده در بالا، ۸۰ روز پس از تولید تعیین شد و سپس توسط رابطه ۲ پایداری انکپسولاسیون (ES) تعیین گردید.

$$ES = \frac{\text{مقدار بتا کاروتن حفظ شده (روز ۸۰م)}}{\text{مقدار بتا کاروتن انکپسوله شده (روز اول)}} \times 100 \quad (2)$$

تجزیه و تحلیل آماری

آزمون‌ها در سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شدند. تحلیل و ارزیابی (ANOVA) با استفاده از مدل خطی (G.L.M) نرم افزار آماری SPSS 16 (version 16.0 for Windows, SPSS Inc) در سطح احتمال ۵٪ ($P < 0.05$) و آزمون چند دامنه‌ای دانکن برای تعیین وجود اختلاف معنی دار بین میانگین‌ها انجام گرفت.

نتایج و بحث

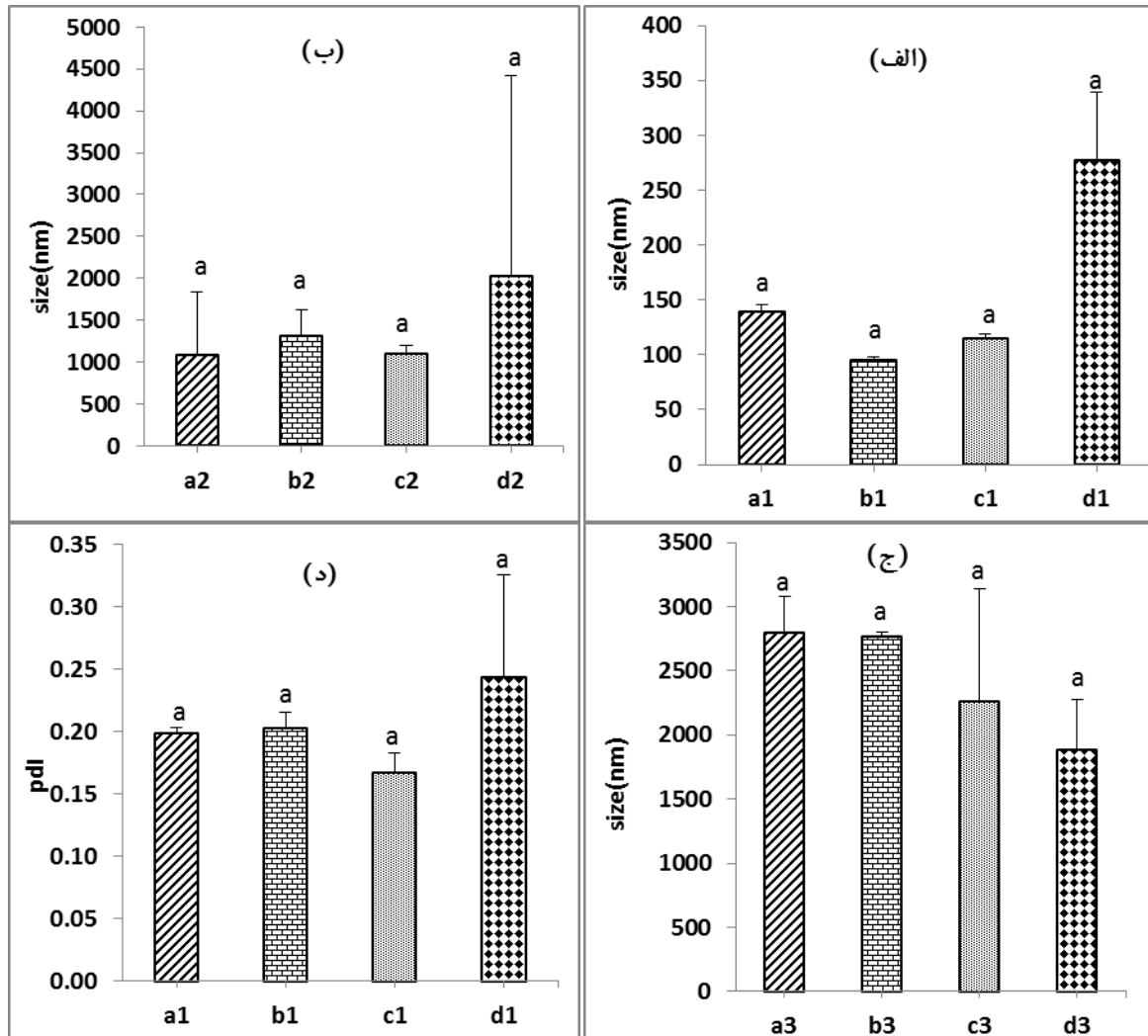
توزیع اندازه ذرات

ابتدا تاثیر نسبت دو بیوپلیمر بر اندازه ذرات در pH=۴/۸ مورد بررسی قرار گرفت. با کاهش pH به ۴/۸، نمونه‌های کازئینات حاوی بتا کاروتن (فاقد صمغ عربی) و کمپلکس‌های کازئینات ۰/۵٪ - صمغ عربی ۰/۱٪ و کازئینات ۰/۵٪ - صمغ عربی ۱٪ دچار رسوب گردیدند، بنابراین اندازه گیری اندازه ذرات این نمونه‌ها ممکن نشد.

¹ - Bridging flocculation

موجب کاهش و افزایش اندازه ذرات گردید و حداقل اندازه ذرات در ۰/۵٪ کازئینات و ۰/۰۲٪ کاراگینان در $pH=4/9$ مشاهده شد.

کازئینات گزارش کردند که افزایش غلظت کازئینات از ۰/۵ به ۱/۵٪ موجب افزایش اندازه ذرات به ویژه در pH بالا (۵/۳) شد ولی افزایش غلظت کاراگینان از ۰/۰۱ به ۰/۰۳٪ در غلظت پایین و بالای کازئینات، به ترتیب

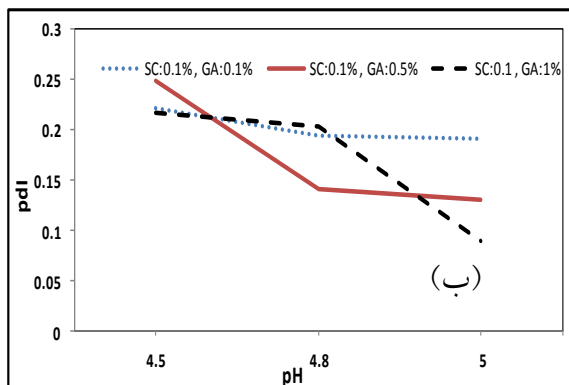
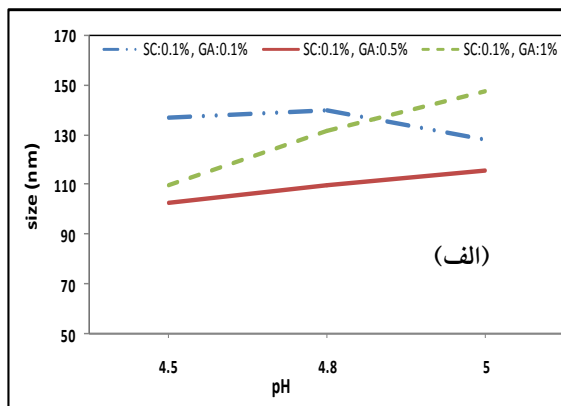


شکل ۱- نمودار اندازه ذرات و توزیع اندازه ذرات نانوکمپلکس های حاوی بتا کاروتن: کازئینات ۰/۱٪ - صمغ عربی ۰/۱٪ (a)، کازئینات ۰/۱٪ - صمغ عربی ۰/۵٪ (b)، کازئینات ۰/۱٪ - صمغ عربی ۱٪ (c)، کازئینات ۰/۵٪ - صمغ عربی ۰/۵٪ (d) در سه مقطع زمانی یک (الف)، ۳۰ (ب) و ۸۰ (ج) روز پس از تولید و توزیع اندازه ذرات در روز اول (د) در $pH=4/8$ ؛ حروف کوچک متفاوت در بالای ستون ها نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح ۵٪ در آزمون مقایسه میانگین ها به روش دانکن می باشد.

میتواند دارای پایداری سینتیکی برای مدت زمان تعریف شده باشد و این سیستم دارای پایداری ترمودینامیکی نمی باشد چون انرژی آزاد گیبس واکنش توده ای شدن و در نتیجه کاهش سطح ذرات، منفی است یعنی واکنش خودبخودی است (قنبرزاده و همکاران، ۱۳۹۲)، بنابراین

مطابق شکل ۱- ب و ج، بررسی های اثر زمان بر اندازه ذرات پس از ۳۰ و ۸۰ روز نشان می دهد که ذرات با گذشت زمان به تدریج بزرگتر می شوند که می تواند نتیجه انبوهش و لخته شدن باشد. سیستم کلئیدی مورد آزمون مانند هر سیستم کلئیدی دیگر فقط

pH بر اندازه ذرات وابسته به هم است و برای هر جفت بیوپلیمر، غلظت و pH بهینه ای وجود دارد. با کاهش pH، بار مثبت کازئین افزایش ولی در مقابل، بار منفی صمغ عربی کاهش می یابد، افزایش بار مثبت می تواند باعث اتصالات بیشتر بین دو بیوپلیمر، پوشش-دهی بهتر و کاهش اندازه ذرات منجر شود.



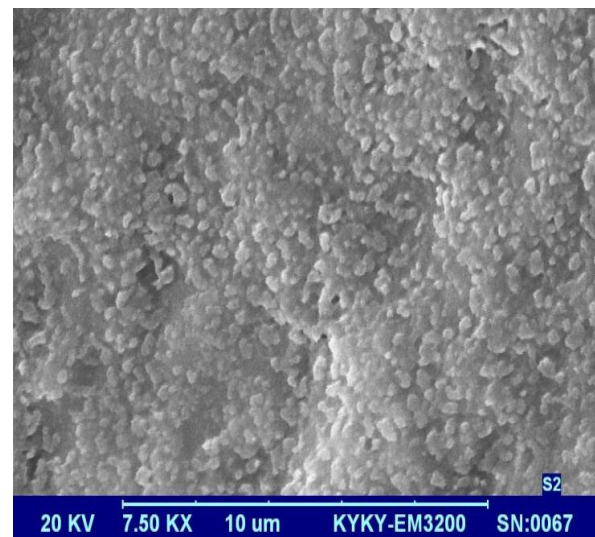
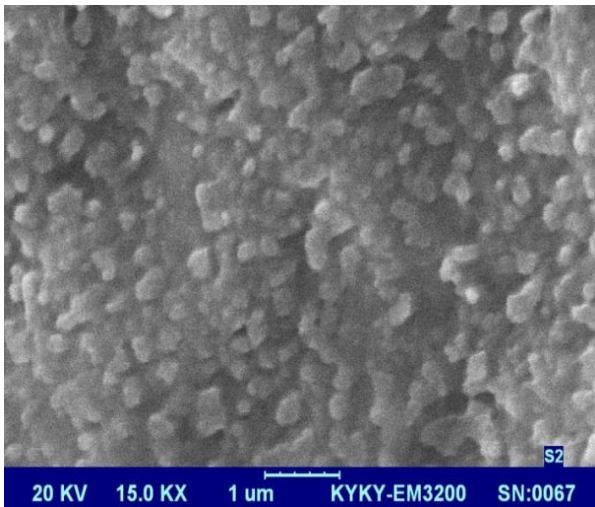
شکل ۲- نمودار اندازه ذرات (الف) و توزیع اندازه ذرات (ب) نانو کمپلکس های کازئینات سدیم (SC) - صمغ عربی (GA) حاوی بتا کاروتن در سه pH متفاوت (۴/۵، ۴/۸، ۵).

ولی در مقابل، کاهش بار منفی صمغ عربی می تواند باعث افزایش امکان توده شدن و در نتیجه افزایش اندازه ذرات گردد، نتیجه نهایی بستگی به غلبه یکی از این عوامل خواهد داشت. به نظر می رسد در غلظت های بالای صمغ، به علت وجود بار منفی کافی، اثر عامل کاهش دهنده غالب بوده و اندازه ذرات کاهش می یابد. خوش منظر و همکاران (۱۳۹۲) طی کار روی نانوکمپلکس کاراگینان-کازئینات، مشاهده کردند که

برای افزایش پایداری سینتیکی باید تمهیدات مختلفی بکار گرفته شود و برای این سیستم نیز لازم است. کارهای تحقیقاتی بیشتری صورت گیرد تا پایداری سینتیکی افزایش یابد.

شکل ۱-د تأثیر غلظت بیو پلیمرها بر روی توزیع اندازه ذرات را نشان می دهد. همان طور که مشاهده می گردد توزیع اندازه ذرات در غلظت های ۰/۱٪ کازئینات - ۰/۱٪ صمغ عربی و ۰/۱٪ کازئینات - ۰/۵٪ صمغ عربی تقریباً یکسان می باشد ولی با افزایش غلظت صمغ عربی تا ۱٪، توزیع اندازه ذرات (الف) می یابد که علت آن می تواند پوشانندگی کافی ذرات توسط صمغ عربی و در نتیجه افزایش نیروی دافعه بین نانوذرات باشد که در نهایت باعث کاهش توزیع اندازه ذرات می شود. با افزایش غلظت کازئینات در غلظت یکسان صمغ عربی، شاهد افزایش توزیع اندازه ذرات هستیم که این پدیده نیز می تواند از ناکافی بودن صمغ برای پوشش دادن مناسب کازئینات موجود باشد نتایج حاصل از توزیع اندازه ذرات با نتایج اندازه ذرات (ب) تا است و با بزرگتر شدن ذرات، توزیع اندازه ذرات - بر - ی افزایش پیدا می کند.

در مرحله دوم بررسی اندازه ذرات، تأثیر تغییرات pH بررسی شد (شکل ۲). نانو کمپلکس های حاوی بتا کاروتن شامل یک سطح غلظت کازئینات سدیم (۰/۱٪) با سه سطح غلظت صمغ عربی (۰/۱، ۰/۵، ۱٪) مورد مطالعه قرار گرفتند. البته اثر کاهش pH در غلظت های مختلف کازئینات حاوی بتا کاروتن نیز مورد بررسی قرار گرفت ولی به علت تشکیل رسوب در غلظت های ۰/۱ و ۰/۵٪ کازئینات، اندازه گیری قطر ذرات ممکن نگردید. در غلظت های پایین صمغ عربی (۰/۱٪)، کاهش pH باعث افزایش جزئی در اندازه ذرات شد به طوری که از ۱۲۸ نانومتر در pH=۵ به ۱۴۰ و ۱۳۷ نانومتر در pH های ۴/۸ و ۴/۵ رسید ولی در غلظت های بالاتر صمغ (۰/۵ و ۱٪)، کاهش pH اثر کاهنده بر اندازه ذرات داشت و این نشان می دهد که تأثیر غلظت بیو پلیمرها،



شکل ۳ - تصاویر میکروسکوپ الکترونی پویشی (SEM) کمپلکس

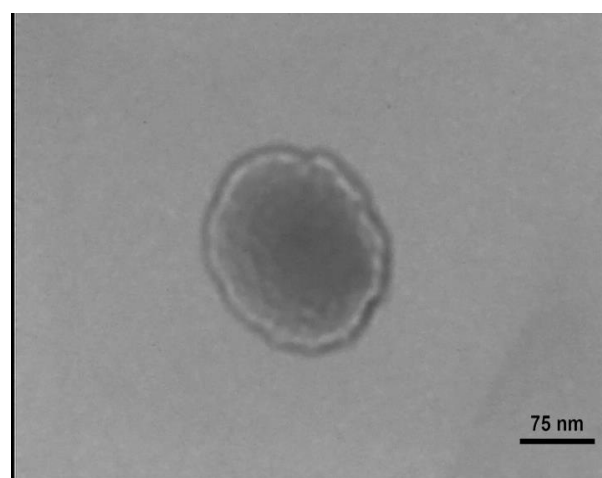
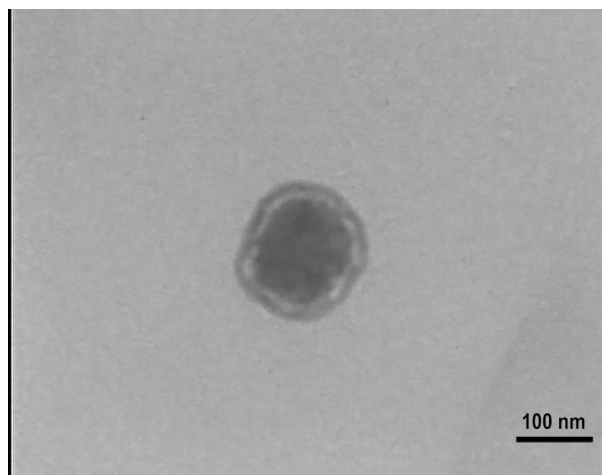
کاهش pH از ۵/۳ به ۵/۱ موجب کاهش اندازه ذرات گردید ولی کاهش آن از ۵/۱ تا ۴/۹ بسته به غلظت دو بیوپلیمر موجب کاهش (در مقادیر کازئینات کم) یا افزایش (در مقادیر کازئینات بالا) در اندازه ذرات گردید. در pH های کمتر از ۴/۹ ذرات رسوب کردند. در تحقیق دیگر بحرانی و همکاران (۱۳۹۲) نشان دادند که کاهش pH از ۵ به ۴/۱ موجب کاهش اندازه ذرات پکتین-کازئینات و کاهش بیشتر به ۳/۹، موجب افزایش اندازه ذرات گردید.

بررسی مورفولوژی نانوکمپلکس ها

به منظور ارزیابی مورفولوژی ذرات نانو کمپلکس های تشکیل شده، تصویر میکروسکوپ الکترونی پویشی (SEM) از نمونه بهینه (کازئینات سدیم ۰/۱ و صمغ عربی ۰/۵٪ در pH = ۴/۸) تهیه شد (شکل ۳). تصویر مربوطه، وجود ذرات کم و بیش کروی با اندازه های نانومتری را نشان داد که نتایج حاصل از اندازه گیری ذرات را تأیید می کند. همان طور که در تصویر نیز مشاهده می گردد نانو ذرات بصورت تنها و متصل به هم در یک بستر شن مانند قرار دارند. به منظور ارزیابی ساختار نانو کمپلکس های تشکیل شده، تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) از نمونه بهینه (کازئینات سدیم ۰/۱ و صمغ عربی ۰/۵٪ در pH = ۴/۸) تهیه شد (شکل ۴). این ذرات دارای اندازه ۷۵-۲۰۰ نانومتر بودند که نتایج حاصل از اندازه گیری ذرات و میکروسکوپ الکترونی روبشی را تأیید می کند. همان طور که در شکل ۵ مشاهده می گردد نانو ذرات به صورت نانو کپسول های حاوی هسته با دیواره ی دو لایه می باشد که انکپسولاسیون بتا کاروتن به وسیله کمپلکس کازئینات و صمغ عربی را تأیید می کند. سطح ذرات کمی زبر و خشن به نظر می رسند که احتمالاً به دلیل وجود رشته های بیوپلیمری صمغ عربی در سطح کمپلکس می باشد و هاله ای سفید رنگ و روشن دور هسته قرار دارد که به لایه کازئیناتی مربوط است.

بر روی میزان بار سطحی و پتانسیل زتای کمپلکس مؤثر است. در این تحقیق، به بررسی تأثیر دو پارامتر غلظت بیو پلیمرها و تغییرات pH بر روی پتانسیل زتا پرداخته شده است.

شکل ۵ اثر تغییرات pH را بر پتانسیل زتای نانو کمپلکس های حاوی بتا کاروتن، متشکل از ۰/۱٪ کازئینات و سه سطح غلظت ۰/۱، ۰/۵، ۱٪ صمغ عربی را نشان می دهد. همان طور که در شکل مشاهده می شود اثر pH بر پتانسیل زتا همانند اندازه ذرات وابستگی بسیاری به غلظت صمغ عربی نشان می دهد؛ در غلظت پایین صمغ عربی (۰/۱٪)، pH عامل تعیین کننده بر تغییرات پتانسیل زتا بوده و همان طور که انتظار می رفت با کاهش pH، مقادیر منفی پتانسیل زتا به مقدار جزئی کاهش یافت و از ۲۱/۲- به ۱۹/۷- رسید. افزایش غلظت صمغ عربی از ۰/۱ به ۰/۵٪ باعث می شود که مقادیر منفی پتانسیل زتا با کاهش pH از ۵ به ۴/۵ روند کاملاً کاهشی نداشته باشد بلکه ابتدا تا pH=۴/۸، پتانسیل زتا منفی افزایش می یابد و سپس دوباره تا pH=۴/۵ روند کاهشی نشان می دهد و در مورد غلظت ۱٪ صمغ عربی روند معکوس ۰/۵٪ مشاهده گردید. در تحقیقی بی و همکاران (۲۰۰۶)، پتانسیل زتای نانوکمپلکس کازئینات سدیم و صمغ عربی بدون هسته را در pH های مختلف مورد ارزیابی قرار دادند و نشان دادند که افزایش نسبت صمغ عربی به کازئینات، موجب کاهش pH خنثی شدن (نقطه ایزو الکتریک) کمپلکس می شود. مشاهدات نشان داد که با گذشت



شکل ۴- تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) نانوکمپلکس کازئینات سدیم ۰/۱٪ - صمغ عربی ۰/۵٪ حاوی بتا کاروتن در pH=۴/۸

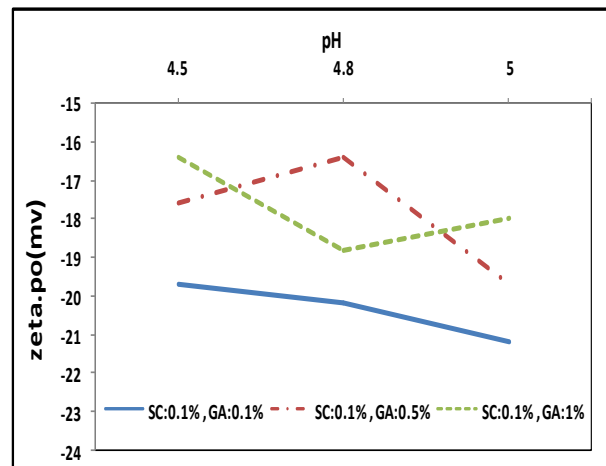
بررسی پتانسیل زتا

در این پژوهش برای مشخص شدن نحوه عمل نیروهای دافعه الکتروستاتیک در کمپلکس صمغ عربی و کازئینات سدیم و میزان پایداری کمپلکس حاصل، از نتایج پتانسیل زتا استفاده شد. پتانسیل زتا یا الکتروستاتیک، اختلاف پتانسیل بین لایه یونی متحرک و لایه غیر متحرک می باشد و بهترین شاخص برای تعیین وضعیت الکتریکی سطحی دیسپرسیون هاست، زیرا نشان دهنده میزان تجمع بار در لایه غیر متحرک و شدت جذب یون-های مخالف به سطح ذره است (قنبرزاده و همکاران، ۱۳۹۲). عوامل مختلفی از جمله pH، قدرت یونی، نوع و غلظت بیوپلیمرهای مورد استفاده، نسبت بین آن ها و ...

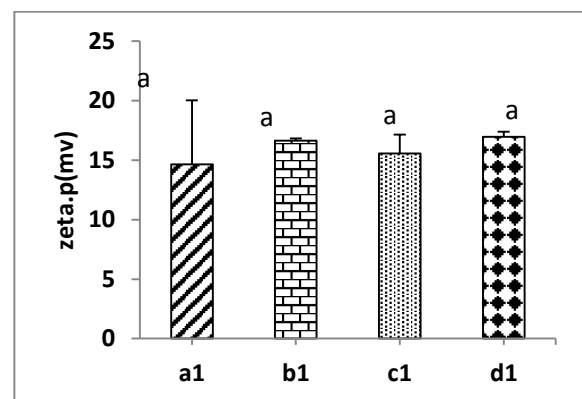
کاهش pH از ۷ به ۵ موجب کاهش شدید پتانسیل زتای کازئینات (از ۲۵ - به ۳- میلی ولت) و عدم تغییر پتانسیل زتای کاراگینان (۲۶/۵-) گردید و در pH تشکیل کمپلکس (pH=۵) پتانسیل زتای کمپلکس بالاتر از بیوپلیمرهای منفرد بود (۳۰- میلی ولت). نتایج بحرانی و همکاران (۱۳۹۲) نیز نشان داد که مقادیر پتانسیل زتای کمپلکس پکتین-کازئینات در تمامی محدوده pH ۳-۷، از بیوپلیمرهای منفرد تشکیل دهنده بالاتر بود و کاهش pH از ۷ به ۳ موجب تغییر پتانسیل زتا از ۳۲- به ۵/۸+ گردید. آنال و همکاران (۲۰۰۸) نیز با بررسی اثر pH بر پتانسیل زتای کیتوزان و کازئین گزارش کردند که pH بر پتانسیل زتا اثر داشته و مقدار آن در حالت تشکیل کمپلکس، در مقادیر میانی کیتوزان و کازئین قرار دارد.

در این تحقیق، داده‌های پتانسیل زتا تطابق کاملی با داده‌های اندازه ذرات نشان ندادند، یعنی pH حداقل اندازه ذرات با pH حداکثر پتانسیل زتای منفی یکسان نبود. این نشان می‌دهد که به احتمال زیاد، پایداری سیستم و جلوگیری از انبوهش ذرات، علاوه بر دافعه الکترواستاتیک، ناشی از ممانعت فضایی ایجاد شده توسط صمغ عربی است.

بررسی تاثیر نسبت دو بیوپلیمر بر پتانسیل زتای ذرات کمپلکس در pH= ۴/۸ نشان داد که تغییر نسبت دو بیوپلیمر موجب تغییر غیرمعنی دار در پتانسیل زتا گردید (شکل ۶). در غلظت یکسان کازئینات، با افزایش میزان صمغ عربی (از ۱/۰٪ به ۵/۰٪)، مقدار منفی پتانسیل زتا افزایش پیدا کرد که می‌توان علت آن را به پوشش دهی مناسب کازئینات در غلظت ۰/۵ نسبت داد. در این حالت، نیروی دافعه منفی سطح ذرات افزایش پیدا کرده و در نهایت میزان منفی پتانسیل زتا افزایش پیدا می‌کند. ولی با افزایش بیشتر غلظت صمغ عربی (از ۵/۰٪ به ۱٪)، میزان منفی پتانسیل زتا کاهش یافت که ممکن است به علت ایجاد اتصال بین زنجیرهای خود صمغ عربی در سطح ذرات و در نتیجه کاهش نیروی



شکل ۵- نمودار پتانسیل زتای نانو کمپلکس های کازئینات سدیم (SC) -صمغ عربی (GA) حاوی بتا کاروتن در سه pH متفاوت (۴/۵، ۴/۸، ۵)



شکل ۶- نمودار پتانسیل زتای نانو کمپلکس های حاوی بتا کاروتن: کازئینات سدیم ۰/۱٪- صمغ عربی ۰/۱٪ (a)، کازئینات سدیم ۰/۱٪- صمغ عربی ۰/۵٪ (b)، کازئینات سدیم ۰/۱٪- صمغ عربی ۱٪ (c)، کازئینات سدیم ۰/۵٪- صمغ عربی ۰/۵٪ (d) در مقطع زمانی یک روز پس از تولید در pH=۴/۸

حروف کوچک متفاوت در بالای ستون‌ها نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح ۵٪ در آزمون مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن می‌باشد.

زمان، مقادیر منفی پتانسیل زتا کاهش یافت (به سمت صفر حرکت کرد) که می‌تواند ناشی از توده ای شدن باشد. خوش منظر و همکاران (۱۳۹۲) نشان دادند که

جدول ۲ - کارایی کپسولاسیون بتاکاروتن در کمپلکس‌های

کانثینات سدیم - صمغ عربی در pH=۴/۸		
کارایی	صمغ عربی	کانثینات سدیم
انکپسولاسیون (%)	عربی	
۱۰۰	۰	۰/۱
۹۹/۸۴	۰/۱	۰/۱
۶۹/۷	۰/۵	۰/۱
۴۹/۸۴	۱	۰/۱
۱۰۰	۰	۰/۵
۱۰۰	۰/۱	۰/۵
۹۷/۳۸	۰/۵	۰/۵
۹۶/۸۳	۱	۰/۵

البته با افزایش غلظت کانثینات از ۰/۱ به ۰/۵ درصد، باز تعداد این مکانها این افزایش یافته و تاثیر صمغ عربی در کاهش کارایی کمتر می‌گردد به عبارت دیگر با افزایش مقدار پروتئین، در مقادیر بالای صمغ عربی، کارایی انکپسولاسیون افزایش یافت. در تحقیقی که رون و همکاران (۲۰۱۰)، انجام دادند مشاهده کردند که مقدار ویتامین D_۲ موجود در کمپلکس بتالاکتوگلوبولین - پکتین (۷۷/۲۶ mg/ml) ۵۵ برابر محیط سرمی بود. لئو و همکاران (۲۰۱۱)، طی پژوهشی در این زمینه نشان دادند که در کمپلکس های زئین - کیتوزان حاوی آلفاتوکوفرول، با افزایش غلظت زئین و کیتوزان، کارایی کپسولاسیون از ۷۶/۵ به ۸۶/۵ درصد افزایش می‌یابد. همچنین آنها نشان دادند که بین کارایی کپسولاسیون نانوذرات زئین - آلفاتوکوفرول و کمپلکس زئین - کیتوزان - آلفاتوکوفرول، اختلاف معنی‌داری وجود ندارد زیرا قبل از افزودن کیتوزان به عنوان پوشش‌دهنده، آلفاتوکوفرول در ساختار زئین قرار می‌گیرد. در تحقیقی دیگر، زیمت و همکاران (۲۰۰۹)، مقدار کارایی انکپسولاسیون DHA در کمپلکس بتالاکتوگلوبولین-پکتین را ۶۴ درصد گزارش کردند، این محققین بیان کردند که تمایل DHA به

دافعه منفی سطح ذرات باشد. مقدار منفی پتانسیل زتای ذرات در کانثینات ۰/۵٪ - صمغ عربی ۰/۵٪ مشاهده می‌شود که احتمالاً در این غلظت، سطح کانثینات به خوبی توسط پلی ساکارید پوشش داده شده است و نیروی دافعه منفی مناسبی در سطح ذرات ایجاد شده است.

ارزیابی کارایی انکپسولاسیون

به منظور محاسبه کارایی انکپسولاسیون، بتاکاروتن در کمپلکس‌هایی شامل دو غلظت ۰/۱ و ۰/۵ درصد کانثینات سدیم و سه سطح غلظت ۰/۱، ۰/۵ و ۱ درصد صمغ عربی در pH=۴/۸ مورد ارزیابی قرار گرفت. مطابق جدول ۲، حداکثر کارایی در کپسول‌هایی کانثیناتی (کمپلکس‌های ناپایدار از نظر کلوئیدی) و همچنین کمپلکس ۰/۱٪ کانثینات - ۰/۵٪ صمغ عربی، مشاهده شد. در مورد کپسول‌های کانثیناتی، بالا بودن کارایی در این ذرات را می‌توان به اندازه بزرگ این کپسول‌ها و در نتیجه بیشتر بودن مکانهای اتصال در این ترکیبات نسبت داد که موجب می‌شود مولکول‌های بتاکاروتن را به طور کامل به دام اندازند ولی این کپسول‌ها به دلیل اندازه بزرگ بعد از تولید، رسوب دادند. با توجه به داده‌های جدول، کاملاً مشخص است که پروتئین کانثینات نقش اصلی را در اتصال به بتاکاروتن را دارد و با افزایش غلظت کانثینات از ۰/۱ به ۰/۵ درصد در ذرات کمپلکس، مقادیر کارایی انکپسولاسیون افزایش یافت. در نانوکپسول‌های پایدار (بدون رسوب) بالاترین میزان کارایی، در غلظت ۰/۱ درصد کانثینات و ۰/۱ درصد صمغ مشاهده گردید (۹۹/۸۴٪) و با افزایش غلظت صمغ عربی کارایی انکپسولاسیون به ویژه در ذرات حاوی ۰/۱ درصد کانثینات کاهش یافت که می‌تواند ناشی از کاهش مکان‌های اتصال پروتئین و پوشانده شدن آنها توسط زنجیرهای گسترده صمغ عربی باشد.

بتالاکتوگلوبولین، ۱۶۶ برابر محیط سرمی است. هاریس و همکاران (۲۰۱۱)، از دو ترکیب کیتوزان هیدروکلرید و تری پلی فسفات پنتا سدیم برای تولید نانوذرات کیتوزان و انکپسولاسیون ترکیبات فنلی استفاده کردند، در این تحقیق کیتوزان با کارایی کپسولاسیون ۸۸٪ به عنوان ترکیبی مناسب برای کپسولاسیون معرفی شد. با توجه به میزان کارایی انکپسولاسیون بالا برای اکثر نانو کمپلکس های کازئینات- صمغ عربی می توان نتیجه گرفت که این کمپلکس های نانو حامل مناسبی برای بتاکاروتن به شمار می روند.

ارزیابی پایداری بتا کاروتن

در این پژوهش، جهت ارزیابی پایداری بتا کاروتن از نانوکپسول هایی که از دو غلظت ۰/۱ و ۰/۵ درصد کازئینات و سه غلظت ۰/۱، ۰/۵ و ۱ درصد صمغ عربی در pH=۴/۸ تهیه شده بودند و پایدار بودند (رسوب ندادند)، در دو مقطع زمانی، آزمون به عمل آمدند، نمونه ها در دمای ۴ °C نگه داری شدند و در زمان های پس از تولید و ۸۰ روز پس از تولید، بتاکاروتن از هسته استخراج شد و میزان آن توسط کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا اندازه گیری شد. بر اساس داده های جدول ۳، بیشترین پایداری در غلظت ۰/۱ درصد کازئینات و ۰/۵ درصد صمغ عربی به دست آمد، بر طبق آزمون های قبلی این نمونه دارای کم ترین اندازه و پتانسیل زتا مناسب نیز بود. پس از گذشت ۸۰ روز از لحاظ پایداری کلوئیدی نیز در مقایسه با سایر نمونه ها در سطح بسیار خوبی قرار داشت، با در نظر گرفتن این مسائل می توان پایداری خوب بتا کاروتن در این غلظت را می توان به پوشش دهی کامل کازئینات توسط صمغ عربی نسبت داد که احتمالاً پوشش دهی مضاعف و مناسب موجب محافظت بهتر بتا کاروتن شده است

جدول ۳ درصد پایداری بتاکاروتن انکپسوله شده در نانوکمپلکس کازئینات سدیم - صمغ عربی در طی هشتاد روز نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی گراد و pH=۴/۸

کازئینات سدیم	صمغ عربی	پایداری بتا کاروتن (%)
۰/۱	۰/۱	۲۱/۴۵
۰/۱	۰/۵	۵۱/۶۵
۰/۱	۱	۵۱/۱۶
۰/۵	۰/۵	۴۱/۹۱

مطابق جدول ۳ با افزایش غلظت صمغ عربی در غلظت های یکسان کازئینات، میزان پایداری نیز افزایش می یابد که این مسأله، نقش مثبت صمغ عربی را در پوشش دهی مضاعف تأیید می کند. در غلظت یکسان صمغ عربی، با افزایش غلظت کازئینات از ۰/۱ به ۰/۵ درصد میزان پایداری به مقدار کمی کاهش می یابد و دلیل آن نیز ممکن است ناکافی بودن صمغ برای این غلظت کازئینات باشد که به علت عدم پوشانندگی مناسب کازئینات توسط صمغ، بتا کاروتن بیشتری در معرض عوامل محیطی تخریب می گردد.

نتیجه گیری کلی

در این پژوهش، نانوکمپلکس های کازئینات سدیم - صمغ عربی حاوی بتا کاروتن، به روش توده ای شدن (کواسرویشون) تولید شدند و به منظور دستیابی به فرمولاسیون مناسب، تأثیر فاکتورهای مختلف از جمله pH، غلظت بیوپلیمرها و نسبت بین آن ها بر خواص نانوکمپلکس حاصله بررسی شد. مهمترین نتایج حاصل از این پژوهش به شرح زیر می باشد: کوچکترین و پایدارترین نانوکمپلکس ها در pH = ۴/۸ و غلظت ۰/۱٪ کازئینات سدیم و ۰/۵٪ صمغ عربی تشکیل شد، کارایی انکپسولاسیون با افزایش غلظت کازئینات سدیم افزایش یافت و حداکثر پایداری در نمونه بهینه از نظر اندازه (۰/۱٪ کازئینات سدیم - ۰/۵٪ صمغ عربی در pH = ۴/۸) حاصل شد.

منابع مورد استفاده

- Anal A K, Tobiassen A, Flanagan J and Singh H, 2008, Preparation and characterization of nanoparticles formed by chitosan–caseinate interactions, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 64, 104–110.
- Bahrani S, Ghanbarzadeh B, Hamishekar H, Sowti M & Hoseini MY, 2013, Study of Thermal Properties, Turbidity, Effective Factors on Particle Size and Oscillatory Rheology of Pectin-Caseinate Biopolymer Nanocomplexes, *Iranian Journal of Polymer Science and Technology*, 25, 6, 433-447, [In Persian].
- Bahrani S, Ghanbarzadeh B, Hamishekar H & Sowti, M, 2013, Nanoencapsulation of omega-3 fatty acids using caseinate-pectin based complexes: FTIR, DSC, particle size, and encapsulation efficiency. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, 8(3), 1-15, [In Persian].
- Chanasattru, W., Griffith Jones, O., Decker, E. A. & McClements, D. J. 2009, Impact of cosolvents on formation and properties of biopolymer nanoparticles formed by heat treatment of Beta-lactoglobulin–Pectin complexes, *Food Hydrocolloids*. 23, 2450–2457.
- Chen L, Remondetto G E & Subirade M, 2006, Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems, *Trends in Food Science and Technology*. 17, 272-283.
- Chaudhry Q., Watkins R. & Castle L. 2010, *Nanotechnologies in the food area: New opportunities, new questions, new concerns*. RSC Publishing. 1-16.
- Desobry S, Netto F & Labbuza T, 1998, Presentation of β -carotene from carrots. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 38, 381-396.
- DeKruif C G & Holt C, 2003, *Casein micelle structure, functions and interactions*. In P. F. Fox, & P. L. H. McSweeney (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry-1, proteins part A*. 233–276.
- Fang Z & Bhesh B, 2010, Encapsulation of polyphenols, *Trend in Food Science and Technology*. 21, 510-523.
- Ghanbarzadeh B, Almasi H & Niknia N, 2013. *Physic and chemistry of food colloidal system and biopolymer solutions*. Sharif University Press
- Harris R, Lecumberri E, Mateos-Aparicio I, Mengibar M & Heras A, 2011, Chitosan nanoparticles and microspheres for the encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*, *Carbohydrate Polymers*. 84, 803–806.
- Hogan, S. A., McNamee, B. F., O’Riordan, E. D. & O’Sullivan, M. 2001, Microencapsulating properties of sodium caseinate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49, 1934–1938.
- Jones, W., Decker, E. A. & McClements, D. J. 2010, Thermal analysis of β -lactoglobulin complexes with pectins or carrageenan for production of stable biopolymer particles, *Food Hydrocolloids*. 24, 239–248.
- Junxia, X., Hai-yan, Y. & Jian, Y. 2011, Microencapsulation of orange oil by complex coacervation with soybean protein isolate/gum Arabic. *Journal of Food Chemistry*. 125, 1267-1272.
- Khoshmanzar, M., Ghanbarzadeh, B., Hamishekar, H. Sowti, M. & Rezayi Mokarram, R. 2013. Investigation of effective parameters on particle size, zeta potential and steady rheological properties of colloidal system based on carrageenan-caseinate nanoparticles, *Research and Innovation in Food Science and Technology*, 4, 272-255, [In Persian].
- Matalanis, A., Jones O. & McClements D. J. 2011, Structure biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds, *Food Hydrocolloid*. 3, 1-16.
- Langer, R. and Peppas, N. A. 2003, Advances in biomaterials, drug delivery, and bionanotechnology, *American Institute of Chemical Engineers*. 49, 299 -306.
- Liang, L., Tremblay-Hébert, V. & Subirade, M. 2011, Characterisation of the β -lactoglobulin/a-tocopherol complex and its impact on a-tocopherol stability, *Food Chemistry*. 126: 821–826.
- Livney, Y. D. 2010, Milk proteins as vehicles for bioactives. *Opinion in colloid and interface science*. 15, 73–83.
- Luo, Y., Zhang, B., You, L., Whent, M. & Wang, Q. 2011, Preparation and characterization of zein/chitosan complex for encapsulation of alfa-tocopherol, and its in vitro controlled release study, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 85, 145-152.

- Ron, N., Zimet, P. & Livney, Y. D. 2010, Beta-lactoglobulin-polysaccharide complexes as nanovehicles for hydrophobic nutraceuticals in non-fat foods and clear beverages, *International dairy journal*. 20, 686-693.
- Semo, E., Kesselman, E., Danino, D. & Livney, Y. D. 2007, Casein micelle as a natural nano-capsular vehicle for nutraceuticals, *Food Hydrocolloids*. 21, 936-942.
- Silva, H., Cerqueira, M., Souza, B., Riberio, C. & Avides, M. 2011, Nanoemulsions of β -carotene using a high-energy emulsification-evaporation technique. *Journal of Food Engineering*. 102, 130-135.
- Sutter, S., Buera, M. & Elizalde, B. 2007, β -carotene encapsulation in a mannitol matrix as affected by divalent cations and phosphate anion. *International Journal of Pharmaceutics*. 332, 45-54.
- Ye, A., Flanagan, J. & Singh, H. 2006, Formation of stable nanoparticles via electrostatic complexation between sodium caseinate and gum arabic, *Biopolymers*. 82, 121-133.
- Ye, A. 2008, Complexation between milk proteins and polysaccharides via electrostatic interaction: principles and applications – a review, *International Journal of Food Science and Technology*. 43, 406-415.
- Zhang G, Foegeding E A & Hardin C C, 2004. Effect of sulfated polysaccharides on heat-induced structural changes in β -Lactoglobulin, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 52: 3975-3981.
- Zimet P & Livney Y D, 2009. Beta-lactoglobulin and its nanocomplexes with pectin as vehicles for omega-3 polyunsaturated fatty acids, *Food Hydrocolloids*. 23, 1120-1126.
- Relkin P & Shukat R, 2012. Food protein aggregates as vitamin-matrix carriers: impact of processing conditions. *Food Chemistry*. 134(4), 2141-2148.
- Zuidam J N & Shimoni E, 2010. Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to make them, *Food hydrocolloid*. 1-10.

Gum arabic- caseinate nanocomplexes bearing β -carotene (2): Studying of particle size distribution, zeta potential, morphology and encapsulation efficiency

M Akrami ¹, B Ghanbarzadeh ^{2*}, F Purzafar ³, A Mortazavi ⁴, R Dinarvand ⁵ and J Dehghannya ⁶

Received: October 25, 2015 Accepted: January 03, 2016

¹MSc Student, Department of Food Science and Technology, University of Tabriz, Tabriz, Iran

²Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, and Tabriz, Iran

³PhD Student, Department of Food Science and Technology, Azad University –Sabzvar branch, Iran

⁴ Professor, Department of Food Science and Technology, Azad University –Sabzvar branch, Iran

⁵ Professor of Medical Nanotechnology Research Center, Tehran University of Medical, Tehran, Iran

⁶Associated Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

*Corresponding Author: Ghanbarzadeh@Tabrizu.ac.ir

Abstract

In this study, properties of caseinate-Arabic gum based nanocomplex (produced by coacervation method) and encapsulation efficiency of β -carotene were investigated. For this purpose, complex formation was investigated by different techniques. The first, sodium caseinate solutions at the levels of 0.1 and 0.5 (w/v%) and Arabic gum at three levels of concentrations 0.1, 0.5, and 1% (w/v%) were prepared. Then β -carotene was loaded to the sodium casein solutions and Arabic Gum was added to them at different levels. The experimental tests showed that particle size and zeta-potential were affected by biopolymers ration and pH. The minimum particle size (95 nm) was observed at pH= 4.5 and in caseinate 0.1%-Arabic gum 0.5% solution however, maximum zeta-potential (-22mV) was observed at pH=5 in 0.1%-Arabic gum 0.1% solution. According to the images obtained from the scanning electron microscopy (SEM) the particles size of 0.1%-Arabic gum 0.5% nano-complex at pH=4.8 was about 100 to 200 nm and in the images obtained from transient electron microscopy (TEM), a nano-particle with core and the two layers wall was observed. The results showed that increasing of caseinate and Arabic gum concentration caused to increase and decrease of encapsulation efficiency, respectively.

Keywords: Encapsulation, Caseinate –Arabic Gum complex, β -Carotene, Particle size, Zeta Potential. Electron Microscopy