

بررسی خواص گرمایی، کدورت و عوامل مؤثر بر اندازه ذرات و رئولوژی نوسانی نانوکمپلکس‌های زیست‌پلیمری پکتین - کازئینات

مجله علوم و تکنولوژی پلیمر،
سال بیست و پنجم، شماره ۶،
صفحه ۴۴۷-۴۳۳، ۱۳۹۱
ISSN: 1016-3255
Online ISSN: 2008-0883

ساجده بحرانی^{۱،۲}، بابک قنبرزاده^{۳*}، حامد همیشه‌کار^{۲*}، محمدیار حسینی^۳

۱- تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکده کشاورزی، گروه علوم و صنایع غذایی، کد پستی ۵۱۶۶۶-۱۶۴۷۱

۲- تبریز، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، کدپستی ۵۱۶۵۶-۶۵۸۱۱

۳- مرند، مرکز تحقیق و توسعه شرکت تکدانه، کدپستی ۱۴۳۹۸-۳۳۴۷۴

دریافت: ۹۱/۴/۷، پذیرش: ۹۱/۱۱/۱۵

چکیده

از انواع نانوکمپلکس‌های استفاده شده برای کپسولی شدن و رهایش کنترل شده مواد غذایی - دارو، نانوکمپلکس‌های زیست‌پلیمری‌اند که از اتصال زیست‌پلیمرهای پروتئینی و پلی‌ساکاریدی تشکیل می‌شوند. در این پژوهش، تشکیل کمپلکس بین پکتین و سدیم کازئینات، با افزودن محلول پکتین (۰/۲، ۰/۴۵ و ۰/۷٪ w/v) به محلول کازئینات (۰/۵، ۱ و ۱/۵٪ w/v) و کاهش pH به زیر نقطه ایزوالکتریک کازئینات سدیم، انجام شد. اثر عوامل مختلف از جمله غلظت زیست‌پلیمر، غلظت نمک، دما و زمان فراصوت‌دهی بر خواص نانوکمپلکس‌های پکتین - کازئینات به عنوان نانوحامل بالقوه بررسی شده است. گرماسنجی پویایی تفاضلی (DSC) و دستگاه اندازه‌گیری اندازه ذرات، به ترتیب برای تشخیص تشکیل کمپلکس و تعیین اندازه و توزیع ذرات استفاده شدند. مطابق نتایج DSC، با اختلاط محلول‌های سدیم کازئینات و پکتین در شرایط اسیدی (pH=۴/۱)، پیک مربوط به پکتین (۲۰۸/۴°C) و کازئین خالص (۲۰۶/۳°C) حذف شده و مخلوط این دو، پیک جدیدی را در دمای بیشتر (۲۴۸/۷°C) نشان می‌دهد. نتایج DSC و کدورت‌سنجی، ایجاد کمپلکس بین پکتین و کازئین در pHهای کمتر از ۵ و نتایج اندازه ذرات، تشکیل پراکنش پایدار، با حداقل اندازه ۸۶ nm را در pH برابر ۴/۱، برای ۱٪ w/v کازئینات و ۰/۴۵٪ w/v پکتین نشان می‌دهد. فراصوت‌دهی با زمان‌های بیش از ۱ min، اندازه ذرات را کاهش داد و افزودن نمک، در غلظت‌های کم و زیاد نتایج متفاوتی را در پایداری سامانه داشته است. با کاهش دمای تولید از ۲۱°C به ۴°C اندازه ذرات نانوکمپلکس کاهش می‌یابد. مطابق نتایج آزمون رئولوژی نوسانی، با افزایش غلظت پکتین، مدول‌های گرانش‌سنجی (G' و G'') افزایش می‌یابد و مدول اتلاف (G'') از مدول ذخیره (G') بزرگ‌تر است.

واژه‌های کلیدی

نانوکمپلکس کازئینات - پکتین،
اندازه ذرات،
گرماسنجی پویایی تفاضلی،
کدورت،
رئولوژی نوسانی

* مسئول مکاتبات، پیام‌نگار:

hamishehkar.hamed@gmail.com , ghanbarzadeh@tabrizu.ac.ir

مقدمه

نانوذرات، ذراتی به ابعاد ۱-۱۰۰ nm هستند و نسبت به میکروذرات یا ذرات با اندازه بزرگ‌تر، خواص متفاوتی دارند. با کاهش اندازه ذرات به مقیاس نانو و در نتیجه افزایش نسبت سطح به حجم، خواص مختلف مانند دسترس‌پذیری زیستی، انحلال‌پذیری در آب، پایداری کلوئیدی و شفافیت محلول‌های حاوی نانوذرات افزایش می‌یابد. در سال‌های اخیر، از رایج‌ترین زمینه‌های کاربرد نانوذرات در صنایع غذایی و دارویی، استفاده از آنها به عنوان حامل‌هایی برای مواد غذایی - دارو (nutraceutical) و مواد زیست‌فعال بوده است. نانوحامل‌های مورد استفاده در فراوری مواد غذایی را می‌توان به دو دسته نانوکمپلکس‌های زیست‌پلیمری و نانوکمپلکس‌های لیپیدی تقسیم کرد [۱]. در تولید نانوکمپلکس‌های زیست‌پلیمری از پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها یا کمپلکس آنها استفاده می‌شود.

پژوهش‌ها نشان داده است که استفاده از کمپلکس‌های زیست‌پلیمری پروتئینی و پلی‌ساکاریدی، پایداری و کاربرد آنها را نسبت به زیست‌پلیمر تنها، بهبود می‌بخشد. تشکیل کمپلکس با ایجاد برهم‌کنش‌های جذبی (عمدتاً الکتروستاتیک) بین پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدهای با بار مخالف یا به عبارت دیگر بین پروتئین‌های با بار مثبت در زیر نقطه ایزوالکتریک ($pH < pI$) و پلی‌ساکاریدهای آنیونی (حاوی گروه‌های کربوکسیل، فسفات و سولفات) در pH بالای pK_a یا پروتئین با بار منفی ($pH > pI$) و پلی‌ساکاریدهای کاتیونی (مانند کیتوسان) رخ می‌دهد. این کار در نهایت، منجر به تولید کمپلکس‌های محلول یا نامحلول می‌شود که به عوامل مختلفی از جمله نوع پلی‌ساکارید استفاده شده (کاتیونی - آنیونی)، ویژگی‌های ساختاری مانند وزن مولکولی، قدرت یونی، نسبت مولی پلی‌ساکارید به پروتئین، قدرت یونی و pH محیط بستگی دارد [۲].

کمپلکس محلول زمانی ایجاد می‌شود که بارهای مخالف دو درشت‌یون موجود در کمپلکس، از نظر تعداد با هم برابر نباشند. در نتیجه شبکه باردار، امکان انحلال را به کمپلکس می‌دهد و دو فاز محلول، یکی غنی از زیست‌پلیمر و دیگری فقیر از زیست‌پلیمر ایجاد می‌شود. اما زمانی که بارهای مخالف دو زیست‌پلیمر یکدیگر را خنثی کنند، کمپلکس نامحلول ایجاد شده و در نتیجه تجمع و هم‌رسوبی اتفاق می‌افتد. زیرا در این حالت، بین ذرات کمپلکس هیچ نیروی دافعه‌ای وجود ندارد و ذرات یکدیگر را دفع نمی‌کنند. عامل مهم دیگر در محلول یا نامحلول شدن کمپلکس، ترتیب و توالی اختلاط زیست‌پلیمرها و تغییرات pH طی آماده‌سازی است. زمانی که اسیدی کردن محلول پس از اختلاط زیست‌پلیمرها انجام شود، اندازه کمپلکس نسبت به حالتی که این عمل پیش از اختلاط انجام شود،

کوچک‌تر است و ثبات بیشتری دارد.

کازئین یکی از بهترین پروتئین‌های قابل استفاده به عنوان نانوکمپلکس و مهم‌ترین پروتئین شیر گاو است. این پروتئین از نوع رشته‌ای با ساختار مارپیچ تصادفی است که در شیر، ساختار میسلی کروی تشکیل می‌دهد. پروتئین‌های کازئینی به انواع آلفا، بتا، کاپا و گاما دسته‌بندی می‌شوند. کازئین‌ها می‌توانند با پیوندهای آبگریز با مواد فعال لیپیدی اتصال برقرار کنند. همچنین، با برهم‌کنش‌های مختلف از جمله برهم‌کنش‌های الکتروستاتیک، هیدروژنی و آبگریز، به پلی‌ساکاریدها متصل شوند [۳]. سدیم کازئینات از رسوب‌دهی اسیدی، شست‌وشو و واکنش با سدیم هیدروکسید و سپس خشک‌کردن افشانه‌ای تولید می‌شود.

پکتین (Pe) یک هتروپلی‌ساکارید آنیونی است و ساختاری شاخه‌دار دارد. در بخش خطی، گالاکتورونیک اسید و متیل استر گالاکتورونیک با اتصالات آلفا ۱-۴ وجود دارند و بخش شاخه‌دار شامل رامنوز، آرابینوز، گالاکتان و گالاکتورونیک اسید است. گروه‌های کربوکسیلیک اسید در گالاکتورون‌ها ممکن است با متیل استری شوند و درجه‌های مختلفی از استری شدن را داشته باشند [۴]. پژوهش‌ها نشان می‌دهد، پکتین کم‌استر (LMP) در محیط اسیدی، روی سطح کازئین با بار مثبت قرار می‌گیرد و با ایجاد دافعه الکتروستاتیکی، از توده‌ای شدن کازئین جلوگیری می‌کند و سبب پایداری ذرات در محیط‌های اسیدی‌تر می‌شود [۵]. همچنین، پژوهش‌های انجام شده روی پکتین با متوکسیل زیاد نشان داد، دافعه فضایی نیز به همراه دافعه الکتروستاتیکی نقش مهمی در پایداری کازئین‌ها دارد [۶].

Zimet و همکاران، تشکیل نانوکمپلکس‌های بتا-لاکتوگلوبولین و پکتین کم‌استر حاوی DHA را ارزیابی کردند. نانوکمپلکس‌ها در شرایط اسیدی و pH برابر ۵/۴ تشکیل شدند. این نانوکمپلکس‌ها با داشتن ذرات با بار منفی، از نظر الکتروستاتیکی پایدار و متوسط اندازه ذرات آن، ۱۰۰ nm گزارش شد [۷]. در پژوهش مشابهی نشان داده شد، پکتین کم‌استر، باعث حفاظت ثانویه و پایداری بیشتر ترکیب آبگریز ویتامین D2 محصور در بتا-لاکتوگلوبولین می‌شود [۸]. این نتایج با نتایج به‌دست آمده توسط Ye، درباره اثر محافظتی نانوکمپلکس‌های LMP و بتا-لاکتوگلوبولین از ویتامین D2 مطابقت دارد [۹]. پژوهش‌های مختلف نشان می‌دهد، عوامل مختلفی مانند نوع پلی‌ساکارید و پروتئین، pH و قدرت یونی، نسبت مولی دو زیست‌پلیمر و مرحله اسیدی کردن بر اندازه ذرات و خواص کمپلکس تشکیل شده مؤثر است.

Jones و همکاران، اثر انواع پکتین (کم‌استر و پراستر)، شرایط مختلف آماده‌سازی مثل pH ، قدرت یونی، غلظت پروتئین و اثر چگالی

به تدریج به آن اضافه و حل شد. محلول حداقل به مدت ۸ h نگهداری شد تا جذب آب پروتئین به حداکثر مقدار برسد. دمای نگهداری پروتئین طی این ۸ h، دمای یخچال بود. پس از گذشت زمان ۸ h و جذب آب به وسیله پروتئین، محلول از کاغذ صافی Whatman ۴۰ با استفاده از پمپ خلأ عبور داده شد.

تهیه محلول‌های پکتین

برای تهیه محلول پکتین با غلظت‌های ۰/۲، ۰/۴۵ و ۰/۷٪، پودر پکتین به آب دوبار تقطیر ۸۰-۷۰°C طی هم‌زدن مداوم افزوده شد. پس از آن به مدت ۱-۱/۵ h برای کاهش دمای محلول، در دمای محیط نگهداری شد. این محلول نیز به منظور کامل شدن جذب آب، حداقل به مدت ۸ h پیش از استفاده، در یخچال نگهداری شد. تمام محلول‌های مورد استفاده روزانه و به شکل تازه تهیه شدند.

تهیه محلول نانوکمپلکس

پس از تهیه محلول‌های کازئین، مقدار ۲ mL نمک تری‌پتاسیم سیترات ۰/۲ مولار به محلول افزوده شد. در ادامه دو محلول نمکی کلسیم کلرید ۰/۰۸ مولار و دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات ۰/۰۸ مولار به ترتیب با مقادیر ۱۰ و ۱۲ mL، طی ۸ مرحله و در فاصله زمانی ۱۵ min به محلول اضافه شدند. در این مرحله، پس از رساندن محلول به حجم مدنظر و تنظیم pH در حالت خشی، محلول‌های پکتین از پیش تهیه شده به محلول پروتئینی افزوده شد و تیتراکردن تا pH مدنظر با HCl ۰/۱ انجام شد. محلول‌های نانوکمپلکس با غلظت‌های مختلف پکتین و سدیم کازئینات تهیه شده است. برای تعیین اثر فراصوت، نمونه‌های کمپلکس در حمام آبی با بسامد ۱۵ kHz به مدت ۱ و ۵ min قرار داده شدند.

آزمون گرماسنجی پویشی تفاضلی (DSC)

اندازه‌گیری‌های گرماسنجی در دستگاه DSC مدل Netzsch 200 F3 ساخت آلمان انجام شد. دستگاه با ایندیم کالیبره شد. از ظرف آلومینیمی خالی به عنوان مرجع استفاده شد. گرمادهی نمونه‌ها با وزن تقریبی ۵ mg با سرعت ۳۰°C/min در گستره دمایی ۵۰ تا ۳۰۰°C انجام شد. از روی دمانگاشت حاصل، دمای ذوب ترکیبات معین شد.

تعیین اندازه ذرات

توزیع اندازه ذرات و قطر متوسط آنها در دستگاه تعیین اندازه ذرات مدل ALD 2101 ساخت ژاپن بر اساس روش پراش نور لیزر، اندازه‌گیری شد. متوسط اندازه ذرات براساس میانگین قطر حجمی

بار پلی‌ساکارید را در تشکیل و خواص نانوذرات زیست‌پلیمری حاصل از عمل‌آوری گرمایی پکتین و بتا-لاکتوگلوبولین بررسی کردند. آنها مشاهده کردند، در محدوده pH ۵-۴/۵ و غلظت بتا-لاکتوگلوبولین ۰/۱ و پکتین ۰/۰۵ درصد، ذرات زیست‌پلیمری با اندازه ۲۵۰-۱۰۰ nm تشکیل شدند. نتایج نشان داد، اندازه و پایداری نانوذرات تشکیل شده، به نوع پکتین استفاده شده بستگی دارد، به طوری که پکتین پراستر، نسبت به پکتین کم‌استر، ذرات پایدارتر و با اندازه‌های کوچک‌تری را تشکیل می‌دهد [۱۰]. در پژوهشی دیگر Bedie و همکاران، اثر عوامل مختلف از جمله نسبت اختلاط دو زیست‌پلیمر، pH محیط و همچنین روش و زمان اسیدی کردن، پیش و پس از اختلاط زیست‌پلیمرها را در تشکیل کمپلکس‌های پکتین کم‌استر و پروتئین جداشده آب پنیر (WPI) حاوی تیامین (ترکیب حساس محلول در آب) مطالعه کردند. آنها نشان دادند، این عوامل بر پایداری، اندازه ذرات و کاهش تخریب تیامین مؤثرند [۱۱].

با توجه به اینکه تا کنون کارایی و ویژگی‌های سامانه حامل کمپلکس کازئینات و پکتین بررسی نشده است، هدف اصلی این پژوهش، تولید و بهینه‌سازی تشکیل این کمپلکس است. از آنجا که کاهش اندازه ذرات به نانو، بهبود خواصی از جمله پایداری و شفافیت را موجب می‌شود، در این پژوهش اثر عوامل مختلف از جمله غلظت‌های مختلف پکتین و کازئین، دما، زمان فراصوت‌دهی و غلظت نمک بر قطر متوسط ذرات نیز بررسی شد. در ضمن، برای بررسی تشکیل و ارزیابی خواص کمپلکس، خواص گرمایی، کدورت و رئولوژی نوسانی بررسی شده است.

تجربی

مواد

سدیم کازئینات (SC) ۸۸٪ پروتئین و ۶٪ رطوبت، از شرکت DMV هلند، پکتین با درجه متوکسیل زیاد از شرکت CP Kelco آمریکا و نمک‌های تری‌پتاسیم سیترات، دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات، کلسیم کلرید، کلریدریک اسید و سدیم هیدروکسید از شرکت Merck آلمان تهیه شدند.

روش‌ها

تهیه محلول‌های کازئینات

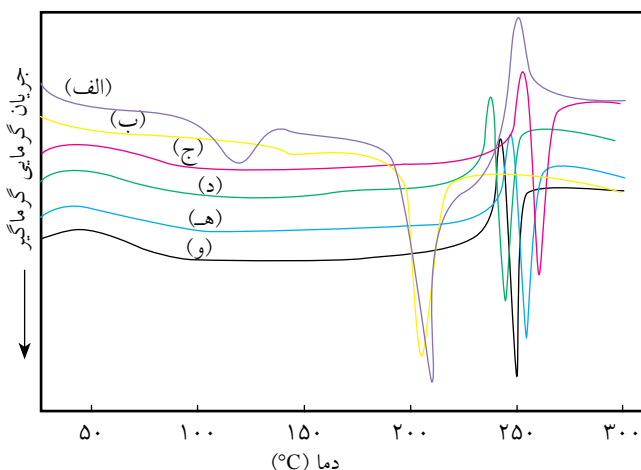
برای تهیه محلول کازئیناتی، ابتدا آب دوبار تقطیر در حمام آبی ۴°C قرار داده شد. سپس، پودر سدیم کازئینات با مقادیر ۰/۰۵ و ۱/۵ g

نتایج و بحث

گرماسنجی پویسی تفاضلی (DSC)

آزمون DSC در ابتدا برای اطمینان از تشکیل کمپلکس بین سدیم کازئینات و پکتین (در مقادیر pH ثابت برابر ۴/۱) و سپس برای بررسی اثر غلظت‌های مختلف زیست‌پلیمری، بر رفتار گرمایی کمپلکس انجام شد. شکل ۱، دمانگاشت DSC مربوط به پودرهای خشک زیست‌پلیمرهای پکتین و سدیم کازئینات خالص و همچنین مخلوط این دو زیست‌پلیمر را با غلظت‌های مختلف و در شرایط اسیدی (pH=۴/۱) نشان می‌دهد. در همه منحنی‌ها، پیک گرمایگر ذوب مشاهده شد. با توجه به اینکه دمای تخریب پکتین ۲۷۰°C تا ۳۶۰°C [۱۲] و سدیم کازئینات ۳۶۰°C [۱۳] است، بنابراین می‌توان دماهای ۲۰۸/۴ °C و ۲۰۶/۳ °C را به ترتیب به پیک گرمایگر ذوب پکتین و کازئینات خالص نسبت داد (جدول ۱). در حقیقت تفکیک پیوندهای درون‌مولکولی و همچنین ذوب نواحی بلوری سبب ظهور پیک‌های گرمایگر در این ترکیبات می‌شود.

با توجه به شکل ۱-الف (منحنی مربوط به پکتین)، پیک گرمایگر دومی در دمای ۱۲۶°C مشاهده می‌شود که احتمالاً مربوط به تبخیر و خروج آب‌های پیوسته از ساختار پکتین یا بخش‌هایی از پلیمر است که نظم و اتصالات بین‌زنجیری کمتری دارند. پکتین همانند سایر کربوهیدرات‌ها تمایل زیادی به ایجاد پیوندهای هیدروژنی با آب دارد. Luo و همکاران، طی بررسی خواص گرمایی محلول‌های نانوکمپلکس زئین-کیتوسان حاوی آلفا - توکوفرول، پیک‌های گرمایگر در دماهای ۷۳/۲ و ۹۱/۲°C را به ترتیب، به تبخیر آب پیوند



شکل ۱- منحنی‌های DSC: (الف) پکتین، (ب) سدیم کازئینات و کمپلکس‌های پکتین سدیم - کازئینات در pH برابر ۴/۱ با غلظت‌های مختلف: (ج) ۰/۲-۱/۵، (د) ۰/۷-۱/۵، (ه) ۰/۲-۰/۵ و (و) ۰/۴۵-۱/۵.

معین شد و تمام نمونه‌ها با سه تکرار اندازه‌گیری شدند. میانگین حجمی (میانگین حجم معادل) به کمک معادله (۱) به دست آمد:

$$\bar{D}[4,3] = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3} \quad (1)$$

توزیع اندازه ذرات با استفاده از معادله (۲) محاسبه شد:

$$\text{Span} = \frac{D(90\%) - D(10\%)}{D(50\%)} \quad (2)$$

۹۰٪، ۵۰٪، ۱۰٪ قطری که حجم ذرات کوچک‌تر از آن به ترتیب ۹۰٪، ۵۰٪ (قطر میانه) و ۱۰٪ حجم کل ذرات موجود را در سامانه تشکیل می‌دهد. مقدار اسپن کمتر، نشان‌دهنده یکنواختی بیشتر در توزیع اندازه ذرات است.

اندازه‌گیری کدورت

کدورت محلول‌های خالص زیست‌پلیمری و کمپلکس حاصل از آنها در دستگاه کدورت‌سنج Heydolph، مدل TN-100 ساخت آلمان در طول موج ۶۰۰ nm اندازه‌گیری شد.

آزمون رئولوژیکی نوسانی

اندازه‌گیری خواص رئولوژیکی نمونه‌های کمپلکس، یک روز پس از آماده‌سازی نمونه‌ها، در دمای ۲۵°C با استفاده از دستگاه رئومتر Physica Anton Paar، مدل MCR 301 ساخت اتریش، با به‌کارگیری استوانه‌های هم‌مرکز انجام شد. پیش از انجام آزمون نوسانی سامانه مدل، محدوده ناحیه خطی گرانروکشن معین شد. بدین منظور، تغییرات مدول ذخیره (G') با افزایش کرنش در بسامد ثابت ۱ Hz اندازه‌گیری شد. محدوده خطی در کرنش کمتر از ۰/۱٪ قرار داشت. بنابراین، آزمون‌های رئولوژیکی نوسانی در محدوده خطی در دمای ۲۵°C انجام شد.

تحلیل آماری

از آزمون آماری فاکتوریل رویه پاسخ Box-bhenken و نرم‌افزار ۱۵ minitab برای بررسی اندازه ذرات استفاده شد. همچنین، آزمون فاکتوریل براساس طرح کاملاً تصادفی با دو عامل (دما و غلظت پکتین) و سه تکرار و آزمون واریانس برای تعیین اثر دما انجام شد. داده‌های به‌دست آمده از سایر آزمون‌ها با استفاده از نرم‌افزار Excel پردازش شد. تمام آزمون‌ها با سه تکرار انجام شدند.

جدول ۱- دمای ذوب و آنتالپی ذوب محلول‌های زیست‌پلمیری و کمپلکس حاصل از آنها.

نمونه	علامت اختصاری	دمای ذوب (°C)	آنتالپی ذوب (J/kg)
پکتین	A	۲۰۸/۴	-
سدیم کازئینات	B	۲۰۶/۳	-۸۲/۳۳
سدیم کازئینات، ۱/۵٪ پکتین، ۰/۲٪	C	۲۵۵/۹	-۶۵/۱
سدیم کازئینات، ۱/۵٪ پکتین، ۰/۷٪	D	۲۴۵	-۸۳/۹۴
سدیم کازئینات، ۰/۵٪ پکتین، ۰/۲٪	E	۲۵۱/۸	-۶۸/۸
سدیم کازئینات، ۱٪ پکتین، ۰/۴۵٪	F	۲۴۸/۷	-۷۵

شده در پودر خالص زئین و کیتوسان نسبت دادند که منطقی به نظر می‌رسد. زیرا، پیک ذوب مربوط به این زیست‌پلیمرها در دماهای بسیار بالاتر قرار دارد [۱۴]. ظهور پیک‌های گرماگیر ناشی از تبخیر آب پیوندی، در پژوهش‌های انجام شده توسط سایر پژوهشگران نیز گزارش شده است که بیانگر تمایل شدید آب به ایجاد پیوند با زیست‌پلیمرهاست. همچنین، آب کاهش‌دهنده دمای انتقال‌های گرمایی مانند ذوب و انتقال شیشه‌ای به‌شمار می‌رود [۱۵، ۱۶].

با توجه به پژوهش‌های انجام شده توسط Kittur، روی رفتار گرمایی کیتوسان و مشتقات آن، مشخص شد که تغییر پیک گرمایی، به عواملی مانند قدرت برهم‌کنش‌های آب - زیست‌پلیمر و همچنین ظرفیت نگه‌داری آب آن ارتباط دارد [۱۷]. وجود گروه‌های آب‌دوست در زیست‌پلیمرها، می‌تواند اتصالات مولکول‌های آب در شبکه پلیمر و به دنبال آن محتوای آب پیوندی را افزایش دهد. در حالی که وجود گروه‌های آب‌گریز، محتوای آب پیوندی را کاهش می‌دهد.

در این باره پژوهش‌هایی را Paula و همکاران، روی رفتار گرمایی کمپلکس کیتوسان صمغ بادام هندی حاوی روغن‌های ضروری انجام داده و به‌طور مشابه گزارش کردند، کپسول‌دار شدن ماده روغنی (آبگریز) با کاهش محتوای آب پیوندی، سبب کاهش دمای پیک گرماگیر مربوط به تبخیر آب به دماهای کمتر می‌شود [۱۸]. همچنین، در پژوهش انجام شده توسط Luo و همکاران روی نانوکمپلکس زئین - کیتوسان حاوی ترکیب آبگریز آلفا - توکوفرول مشخص شد، پیک گرماگیر نانوذرات زئین - توکوفرول و زئین - کیتوسان توکوفرول در مقایسه با نمونه‌های پودری کیتوسان، به دماهای پایین‌تری منتقل می‌شود که نشان‌دهنده کاهش تمایل نانوکمپلکس حاوی توکوفرول به اتصال با آب است [۱۴].

همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، با اختلاط محلول‌های ۱٪ سدیم کازئینات و ۰/۴۵٪ پکتین در شرایط اسیدی (pH=۴/۱)، پیک مربوط به پکتین و کازئین خالص حذف شده و مخلوط این دو، یک پیک جدید را در دمای بیشتر (۲۴۸/۷°C) نشان می‌دهد.

جابه‌جایی پیک دمای ذوب و همچنین نبود دو پیک مربوط به ترکیبات اولیه کازئین و پکتین نشان می‌دهد، احتمالاً برهم‌کنش جذبی الکتروستاتیک بین گروه‌های کربوکسیل پکتین (-COO-) و گروه‌های آمینی کازئین (-NH₃⁺) ایجاد شده است و تشکیل کمپلکس بین این دو ترکیب، ماده جدیدی را ایجاد کرده که خواص آن با ترکیبات سازنده اولیه متفاوت است.

Zaleska و همکاران، نیز طی پژوهشی بر خواص گرمایی کمپلکس نشاسته سیب‌زمینی و پروتئین جداسازی شده آب پنیر، جابه‌جایی پیک گرماگیر نمونه کمپلکس نسبت به مواد خام اولیه و قرار گرفتن آن در بین پیک‌های گرماگیر نشاسته و پروتئین را به دلیل برقراری کمپلکس و تشکیل ساختار جدید گزارش کردند [۱۹]. در پژوهش انجام شده، گزارش شده است که در غلظت‌های زیاد پروتئین، افزودن پلی‌ساکاریدها و تشکیل کمپلکس، در اکثر موارد، پایداری پروتئین را در برابر واسرشتی (denaturation) گرمایی افزایش می‌دهد [۲۰، ۲۱]. این نتیجه در پژوهش Huan و همکاران، نیز مشاهده شد. آنها نشان دادند، دمای واسرشتی پروتئین جداسازی شده دانه سویا از ۷۸°C به ۸۵°C با تشکیل کمپلکس افزایش می‌یابد. افزون بر این، پیک جدیدی در دمای ۵۸°C مشاهده شد که تأییدکننده تغییر در ساختار هر یک از ترکیبات اولیه بود [۲۲]. اما، در پژوهش دیگری که روی کمپلکس‌های پلی‌ساکاریدهای پکتین پراستر، پکتین کم‌استر و کاراگینان با پروتئین بتا-لاکتوگلوبولین در غلظت‌های کم پروتئین انجام شد، اثر پایدارکنندگی مشاهده نشد و مکان پیک ذوب تغییر نیافت [۱۰]. این موضوع نشان می‌دهد، اثر این پلی‌ساکاریدها، به غلظت پروتئین و برهم‌کنش‌های بین زنجیرهای پروتئین بستگی دارد. با توجه به شکل ۱ مشاهده می‌شود، افزایش غلظت پکتین از ۰/۲ به ۰/۷ در مقادیر ثابت سدیم کازئینات (۱/۵٪)، دمای ذوب را از ۲۵۵/۹°C به ۲۴۵°C کاهش داده است. اما در مقادیر ثابت پکتین (۰/۲٪)، افزایش غلظت سدیم کازئینات از ۰/۵ به ۱/۵٪، سبب افزایش دمای ذوب کمپلکس شده و دمای ذوب از ۲۵۱/۸°C به ۲۵۵/۹°C افزایش یافته است (جدول ۱). همان‌طور که گفته شد، نسبت بین زیست‌پلیمرها نقش معین‌کننده‌ای در تشکیل کمپلکس و خواص مربوط به آن دارد. نتایج مربوط به بررسی اندازه ذرات کمپلکس نشان داد، افزایش غلظت سدیم کازئینات در مقادیر ثابت پکتین (۰/۲٪) و همچنین کاهش غلظت پکتین در مقادیر ثابت سدیم کازئینات (۱/۵٪) سبب افزایش اندازه ذرات شد. با توجه به این نتایج می‌توان استنباط کرد، افزایش اندازه ذرات کمپلکس، که نشان‌دهنده افزایش برهم‌کنش‌ها و درگیری بین این دو زیست‌پلیمر است، دمای ذوب را افزایش می‌دهد. مطابق شکل، در منحنی مربوط به پکتین و

جدول ۲- تحلیل واریانس غلظت‌های مختلف پکتین و سدیم کازئینات بر اندازه ذرات.

مشخصات	ضریب همبستگی	t-value	p-value
ثابت معادله	۹۱/۸۳	۰/۲۰۲	۰/۸۴۲
سدیم کازئینات	۱۷۲۹/۳۱	۶/۲۰۴	<۰/۰۰۰۱
پکتین	-۲۴۸۶/۳۸	-۸/۹۲۰	<۰/۰۰۰۱
سدیم کازئینات × سدیم کازئینات	۱۵۳۲/۸۳	۳/۷۳۶	۰/۰۰۱
پکتین × پکتین	۲۲۳۸/۷۱	۵/۴۵۶	<۰/۰۰۰۱
پکتین × سدیم کازئینات	-۳۲۳۵/۱۳	-۸/۲۰۷	<۰/۰۰۰۱

*: نشان‌دهنده اثر متقابل است.

کازئینات (۰/۵٪) موجب افزایش اندازه ذرات شده است. همچنین مشاهده شد، در غلظت‌های ۰/۲٪ پکتین، افزایش غلظت سدیم کازئینات از ۰/۵٪ به ۱/۵٪، اندازه ذرات کمپلکس تشکیل شده را به شدت افزایش می‌دهد، به طوری که این مقدار از ۱۵۰ nm برای کازئینات سدیم ۰/۵٪ به ۱۲۰۲۵ nm برای سدیم کازئینات ۱/۵٪ افزایش یافت. نتایج مربوط به اندازه ذرات در جدول ۳ نشان می‌دهد، در مقادیر مختلف پکتین و سدیم کازئینات، متوسط قطر حجمی در محدوده ۸۶-۱۲۰۶۹ nm قرار دارند.

در محیط اسیدی، وجود پکتین برای پایداری و کاهش اندازه ذرات کمپلکس لازم است. زیرا کازئین با اسیدی شدن محیط و کاهش pH تا زیر ۴/۶ (نقطه ایزوالکتریک) بار الکتریکی خود را از دست داده و تشکیل رسوب می‌دهد.

پلی‌ساکاریدها از جمله پکتین که بار منفی دارند، می‌توانند از توده‌ای شدن کازئین در شرایط اسیدی جلوگیری کنند. در این شرایط علاوه بر ایجاد ممانعت فضایی حاصل از رشته‌های پکتین، ایجاد

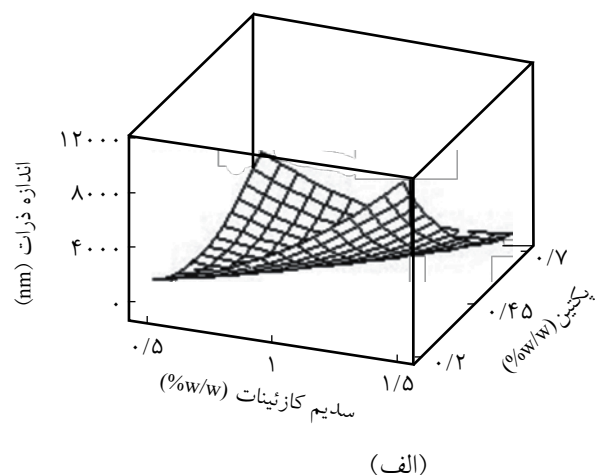
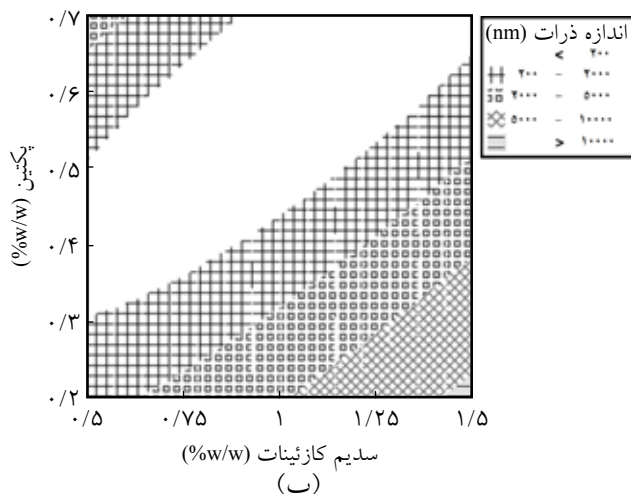
کمپلکس‌ها، یک پیک گرمزا در محدوده دمایی ۲۳۰°C تا ۲۵۰°C مشاهده می‌شود، این مسئله نشان می‌دهد، یک واکنش گرمزا در این محدوده رخ می‌دهد و نمی‌تواند به بلوری شدن مربوط باشد.

اندازه ذرات و توزیع اندازه ذرات

اثر غلظت‌های مختلف زیست‌پلیمر بر اندازه ذرات

نتایج جدول ۲ نشان می‌دهد، غلظت پکتین و کازئینات و همچنین اثر متقابل بین آنها بر اندازه ذرات مؤثر بوده و در سطح ۱٪ معنی‌دار است. R^2 در این آزمون ۹۴/۶۶٪ به دست آمد و زیاد بودن مقبولیت آن را نشان داد. طبق تحلیل‌های رگرسیونی، هر چه ارزش t بیشتر و ارزش p کمتر باشد، اثر پارامتر مربوط معنی‌دارتر است. با توجه به این مطلب، پکتین با $p < ۰/۰۰۰۱$ و $t = -۸/۹۲۰$ بیشترین اثر را در تعیین اندازه ذرات دارد و پس از آن بیشترین اثر به ترتیب، مربوط به اثر متقابل پکتین و سدیم کازئینات ($t = -۸/۲۰۷$ و $p < ۰/۰۰۰۱$) و در نهایت سدیم کازئینات ($t = ۶/۲۰۴$ و $p < ۰/۰۰۰۱$) است. ضریب همبستگی مثبت برای سدیم کازئینات، رابطه مستقیم بین این پارامتر و اندازه ذرات را نشان می‌دهد. مقدار منفی آن برای پکتین و پکتین - سدیم کازئینات نشان می‌دهد، بین متغیرهای مستقل و وابسته رابطه عکس وجود دارد.

شکل ۲- الف، نمودار رویه پاسخ اندازه ذرات را به عنوان تابعی از غلظت پکتین و سدیم کازئینات در $pH=۴/۱$ نشان می‌دهد. با در نظر گرفتن مقادیر ثابت سدیم کازئینات، مشاهده شد که پکتین با غلظت‌های مختلف، دارای آثار متفاوتی بر اندازه ذرات کمپلکس است. به طوری که افزایش آن در غلظت‌های زیاد سدیم کازئینات (۱/۵٪)، اندازه ذرات را کاهش می‌دهد و در مقادیر کم سدیم



شکل ۲- اثر پکتین و سدیم کازئینات بر اندازه ذرات کمپلکس در $pH=۴/۱$: (الف) نمودار رویه پاسخ و (ب) نمودار دوبعدی.

جدول ۳- اثر غلظت‌های مختلف سدیم کازئینات و پکتین بر اندازه ذرات در pH برابر ۴/۱.

Span (nm)	قطر حجمی (nm) ± انحراف معیار میانگین	B ^۱	A ^۱
۰/۹۳ ± ۰/۰۲	۸۶ ± ۵	۰/۴۵	۱
۴/۶۲ ± ۰/۰۲	۲۲۰۰ ± ۱۰۳	۰/۷	۰/۵
۰/۸۹ ± ۰/۶۷	۹۹ ± ۶	۰/۴۵	۱
۰/۹۳ ± ۰/۵۳	۹۳ ± ۸	۰/۴۵	۱
۰/۸۷ ± ۰/۰۵	۸۶ ± ۵	۰/۴۵	۱
۴/۴۲ ± ۰/۰۹	۲۱۰۰ ± ۸۶	۰/۷	۰/۵
۰/۷۹ ± ۰/۱۵	۱۰۹۴ ± ۷۲	۰/۷	۱/۵
۲/۶۷ ± ۰/۰۰	۱۵۰ ± ۳۰۵	۰/۲	۰/۵
۲/۸۴ ± ۰/۰۱	۱۲۰۲۵ ± ۳۳۷	۰/۲	۱/۵
۰/۹۶ ± ۰/۰۱	۹۳ ± ۶	۰/۴۵	۱
۰/۷۱ ± ۰/۰۹	۹۴ ± ۱	۰/۴۵	۱
۰/۸۳ ± ۰/۲۴	۱۱۹ ± ۳۸	۰/۷	۱/۵
۲/۸۴ ± ۰/۰۸	۱۲۰۶۹ ± ۸۴۸	۰/۲	۱/۵
۲/۶۷ ± ۰/۰۰	۱۵۰ ± ۲۱۸	۰/۲	۰/۵

۱- سدیم کازئینات و ۲- پکتین (%w/w) است.

افزایش می‌یابد [۷].

بررسی‌های انجام شده توسط Girard و همکاران، روی برهم‌کنش‌های پکتین کم‌استر - بتا-لاکتوگلوبولین طی تشکیل نانوکمپلکس نشان داد، اساس برهم‌کنش‌ها، پیوندهای یونی و هیدروژنی است و در pH برابر ۴/۵، بیشترین مقدار پروتئین با LMP کمپلکس تشکیل می‌دهد. این پژوهشگران بیان کردند، در محدوده pH زیر نقطه ایزوالکتریک بتا-لاکتوگلوبولین (PI= ۵/۱۸) که پروتئین بار مثبت دارد، با افزودن مقادیر اضافی پکتین با بار منفی، می‌توان نانوکمپلکس‌های محلول با دافعه الکتروستاتیک قوی ایجاد کرد [۲۴]. رعایت نسبت مناسب بین زیست‌پلیمرها نقش معین‌کننده‌ای در اندازه ذرات کمپلکس دارد. Bedie و همکاران، تشکیل کمپلکس‌های پکتین (LMP) و پروتئین جدا شده آب پنیر (WPI) را برای به‌دام انداختن و حفاظت از تیامین (ترکیب حساس محلول در آب) در غذاهای اسیدی، مطالعه کردند. طبق نتایج به‌دست آمده مشخص شد که برهم‌کنش‌های الکتروستاتیک برای تشکیل کمپلکس‌های WPI و LMP، به شدت به نسبت اختلاط دو زیست‌پلیمر، روش و زمان اسیدی‌کردن و pH محیط وابسته است. آنها مقادیر بهینه‌ای که در آن بیشترین تعداد کمپلکس مشاهده شد، اختلاط محلول‌های زیست‌پلیمری، بین ۳-۳/۵ برای pH و نسبت ۱:۲ را برای پروتئین: پلی‌ساکارید گزارش کردند [۱۱].

پژوهش‌های Luo و همکاران روی کمپلکس زئین - کیتوسان حاوی توکوفرول نشان داد که با افزودن کیتوسان به محلول زئینی به نسبت ۱ به ۲۰، اندازه ذرات از ۸۰۰ به ۲۱۱ nm کاهش می‌یابد و سپس با ازدیاد غلظت آن به نسبت ۱ به ۱۰ و ۱ به ۵، اندازه ذرات دوباره افزایش می‌یابد. همچنین، با افزایش غلظت پروتئین زئین از ۵ به ۱۵ mg/mL در نسبت ۱۰ به ۱ زئین به کیتوسان، اندازه ذرات کاهش می‌یابد. سپس، با افزایش غلظت به ۲۰ mg اندازه ذرات مجدداً افزایش می‌یابد [۱۴].

در حالت تشکیل کمپلکس، پکتین باید بتواند به‌طور کامل سطح کازئین را بپوشاند. اگر نسبت بین پکتین و سدیم کازئینات کاهش یابد، پروتئین به‌طور کامل با پکتین پوشیده نمی‌شود و پروتئین‌های آزاد با نزدیک‌شدن به نقطه ایزوالکتریک، از نظر بار الکتریکی خنثی شده و پایداری خود را از دست می‌دهند. این پروتئین‌ها با از بین رفتن نیروی دافعه الکتروستاتیک به یکدیگر پیوسته و بزرگ‌تر می‌شوند و در نهایت به شکل توده و رسوب درمی‌آیند [۲۵،۲۶]. از سوی دیگر در این شرایط، پکتین می‌تواند در طول زنجیر خود با چند کازئین برهم‌کنش دهد و با ایجاد پل بین مولکول‌های کازئین، سبب افزایش اندازه ذرات و توده‌ای شدن آنها شود. در غلظت‌های

برهم‌کنش‌های الکتروستاتیک بین پکتین و کازئین نیز باعث ایجاد پایداری و جلوگیری از تشکیل توده و رسوب شده و موجب کاهش اندازه ذرات می‌شود [۵،۲۳]. Ron و همکاران، اثر پکتین کم‌استر را بر تشکیل کمپلکس پکتین و بتا-لاکتوگلوبولین و اندازه ذرات بررسی و گزارش کردند که پکتین در مقادیر بیش از ۰/۰۱ درصد در محیط اسیدی، با ایجاد برهم‌کنش‌های الکتروستاتیک سبب پایداری و کاهش اندازه ذرات کمپلکس می‌شود. در این پژوهش، حداقل اندازه ذرات (۴۹-۵۰ nm) در pH برابر ۴/۲۵ و غلظت پکتین ۰/۵ و ۰/۷۵ درصد به‌دست آمد و خارج از این محدوده غلظت، اندازه ذرات افزایش یافت. با افزایش pH به ۴/۵ (نزدیک به نقطه ایزوالکتریک پروتئین) اندازه ذرات به غلظت پکتین وابستگی بیشتری نشان داد که به وابستگی بیشتر پروتئین به وجود پکتین، برای جلوگیری از لخته‌شدن، نزدیک نقطه خنثی شدن نسبت داده شد [۸].

پژوهش Zimet و همکاران روی کمپلکس پکتین - بتا-لاکتوگلوبولین حاوی اسید چرب DHA نشان داد، افزایش غلظت پکتین تا حد معینی باعث کاهش اندازه کمپلکس حاصل می‌شود. ذرات با کمترین قطر (۱۱۰ nm) در غلظت بین ۰/۳۷۵ و ۰/۱۲۵ درصد پکتین حاصل می‌شوند و در بیشتر از غلظت ۰/۱۲۵ درصد، قطر ذرات مجدداً

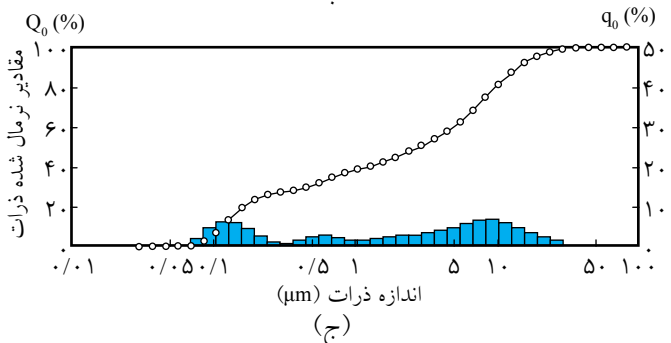
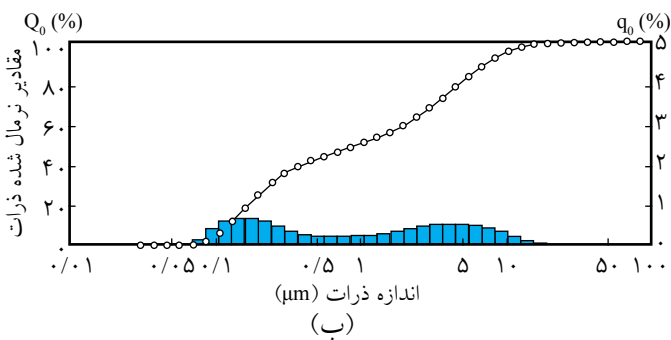
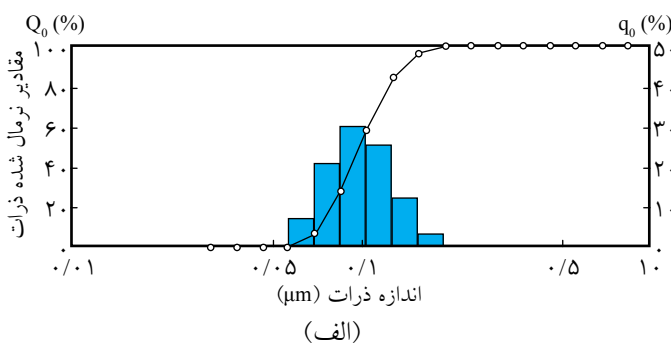
به یکدیگر افزایش داده و سبب به هم چسبیدن ذرات و افزایش اندازه متوسط آنها شده است. اما، با افزایش بیشتر زمان فراصوت‌دهی، نتیجه عکس مشاهده شد. در کمپلکس حاوی ۱٪ سدیم کازئینات و ۰/۲٪ پکتین مشاهده می‌شود، افزایش زمان فراصوت‌دهی تا ۵ min، اندازه ذرات را به شدت کاهش می‌دهد. این موضوع احتمالاً به دلیل شکسته شدن توده‌های کمپلکس تشکیل شده در نمونه، در اثر افزایش مدت زمان فراصوت‌دهی است. این اثر درباره دو ترکیب دیگر چندان محسوس نیست. با توجه به اندازه کوچک ذرات در این سامانه‌ها و عدم تأثیر زمان فراصوت‌دهی بر این ترکیبات، می‌توان نتیجه گرفت که در این سامانه‌ها، ترکیبات توده‌ای به مقدار خیلی کم است یا اصلاً وجود ندارد. نتایج مربوط به این آزمون در جدول ۴ گزارش شده است. Seshadri و همکاران در بررسی اثر فراصوت بر اندازه ذرات و کدورت ژل پکتینی، گزارش کردند که امواج فراصوت سبب کاهش

کم سدیم کازئینات نیز، افزایش مقدار پکتین سبب ایجاد فشار اسمزی شده و لایه آب بین دو مولکول کازئین تخلیه می‌شود. این موضوع سبب به هم پیوستن مولکول‌ها و ایجاد انبوهش ناشی از تهی شدن آب می‌شود [۲۵]. بنابراین همان‌طور که گفته شد، رعایت نسبت مناسب بین پروتئین و پلی‌ساکارید از عوامل مهمی است که در تولید نانوذرات باید به آن توجه کرد.

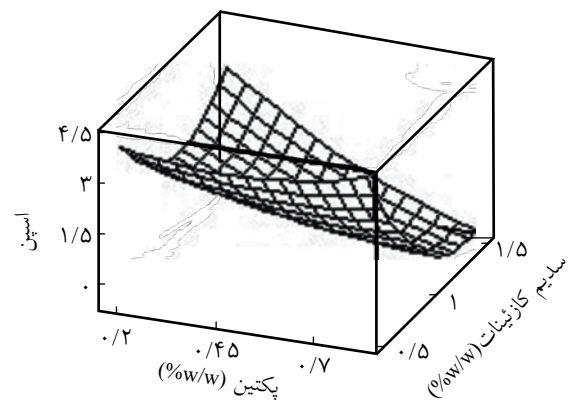
نمودار دوبعدی شکل ۲-ب به‌وضوح محدوده مناسب را برای تشکیل نانوکمپلکس بین پکتین و کازئین نشان می‌دهد. با توجه به این شکل مشاهده می‌شود، برای تشکیل نانوکمپلکس، با افزایش سدیم کازئینات مقدار بیشتری پکتین مورد نیاز است. توزیع اندازه ذرات از نظر کارایی و پایداری فیزیکی و خواص رئولوژیکی محصول اهمیت ویژه‌ای دارد. معمولاً با افزایش توزیع اندازه ذرات، پایداری کلوئیدی و گرانیروی محلول‌ها کاهش می‌یابد. بنابراین در این پژوهش، برای بررسی مقدار پراکندگی ذرات از پارامتر اسپین استفاده شد. در جدول ۳، اثر متغیرهای پکتین و سدیم کازئینات روی توزیع اندازه ذرات نشان داده شده است. شکل ۳ نشان می‌دهد، در مقدار ثابت سدیم کازئینات (۱٪) بهترین توزیع اندازه ذرات مربوط به پکتین ۰/۴۵ است. توزیع اندازه ذرات برای نمونه مزبور تک‌قله‌ای و برای سایر نمونه‌ها چندقله‌ای بود. شکل ۴-الف تا ج نمودار توزیع اندازه ذرات نمونه‌ها را در pH برابر ۴/۱ نشان می‌دهد.

اثر زمان فراصوت‌دهی بر اندازه ذرات

شکل ۵ اندازه ذرات کمپلکس را به عنوان تابعی از زمان فراصوت‌دهی نشان می‌دهد. با توجه به این شکل، در تمام نمونه‌ها، بزرگ‌ترین اندازه ذرات مربوط به زمان ۱ min فراصوت‌دهی است. احتمالاً فراصوت‌دهی مقدار تحرک ذرات و در نتیجه درصد برخورد آنها را



شکل ۴- توزیع اندازه ذرات در pH برابر ۴/۱، غلظت ۱٪ سدیم کازئینات و پکتین: (الف) ۰/۴۵٪، (ب) ۰/۷٪، (ج) ۰/۲٪.



شکل ۳- نمودار رویه پاسخ اثر متقابل پکتین - سدیم کازئینات در توزیع اندازه ذرات در pH برابر ۴/۱.

مختلف در جدول ۵ آمده است. نتایج جدول نشان می‌دهد، کاهش دمای تولید از ۲۱°C به ۴°C، سبب کاهش اندازه ذرات شده است. اما همان‌طور که در جدول ۶ ملاحظه می‌شود، این اختلاف از نظر آماری در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار نیست. این نتیجه با نتایج به‌دست آمده از پژوهش Zimet و همکاران تطابق دارد. این پژوهشگران اثر دمای پاستوریزه‌کردن، دمای محیط و دمای ۴°C را بر اندازه ذرات کازئین ارزیابی و بیان کردند که کاهش دما سبب کاهش جزئی در اندازه ذرات می‌شود. اما، این اختلاف از لحاظ آماری معنی‌دار نیست [۷]. همچنین جدول ۶ نشان می‌دهد، اثر متقابل بین دما و غلظت پکتین، در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار نیست. اما همان‌طور که پیش‌تر نیز گفته شد، اثر غلظت پکتین بر اندازه ذرات معنی‌دار است.

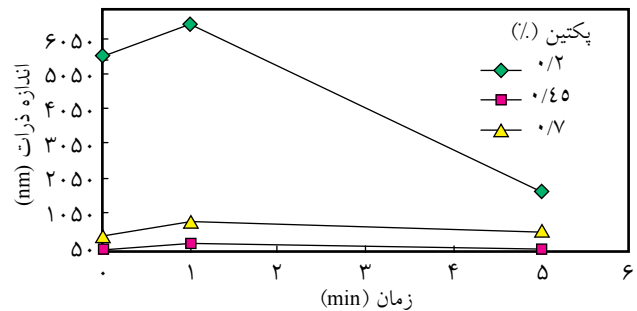
اثر نمک روی پایداری سامانه کلئیدی

برای تعیین اثر نمک پایداری سامانه، محلول کمپلکس ۱٪ کازئینات و ۰/۴۵٪ پکتین با غلظت‌های مختلف نمک (جدول ۷) تهیه شده و نمونه‌ها در لوله آزمایش به مدت ۶۰ روز در دمای محیط نگهداری شدند (شکل ۶). نتایج به‌دست آمده نشان داد، با افزودن نمک تری‌پتاسیم سیترات ۰/۲ مولار به سامانه، مقدار پایداری نسبت به نمونه شاهد (بدون نمک) افزایش یافته و در سامانه رسوبی مشاهده نشده است. اما، با افزایش غلظت نمک تری‌پتاسیم سیترات به ۱ مولار، پایداری سامانه از بین رفته است. این موضوع احتمالاً به دلیل خارج شدن مقدار آب در دسترس نانوکمپلکس‌های پکتین - کازئینات است که در غلظت‌های زیاد نمک اتفاق می‌افتد. در این غلظت، به دلیل فراوانی یون‌ها در محیط، مقدار انحلال‌پذیری کاهش یافته (پدیده salting out) و در نتیجه رسوب تشکیل می‌شود. در این شرایط می‌توان با افزودن مقدار مناسب پلی‌ساکارید به محیط، جذب آب و گرانیوی محیط را افزایش داد و پایداری سامانه را بهبود بخشید.

جدول ۵- میانگین اندازه ذرات در دمای ۴°C و دمای محیط.

میانگین اندازه ذرات* (nm) ± انحراف معیار	دما (°C)	پکتین (%w/w)
۵۴۵۲ ± ۱۵۵	۴	۰/۲
۵۹۵۷ ± ۶۴۷	۲۱	۰/۲
۸۱ ± ۳	۴	۰/۴۵
۱۵۸ ± ۴۱	۲۱	۰/۴
۵۱۹/۵ ± ۱۲	۴	۰/۶
۵۳۵/۵ ± ۳۳	۲۱	۰/۶

* مربوط به سه تکرار است.



شکل ۵- اثر زمان فراصوت‌دهی بر اندازه ذرات کمپلکس حاوی ۱٪ سدیم کازئینات در pH برابر ۴/۱.

اندازه ذرات، کسر حجمی و تغییر شکل آنها شده و در نتیجه مقدار کدورت کاهش می‌یابد [۲۷].

Teng و همکاران نیز با اعمال فراصوت بر پروتئین سرم آلبومین، شاهد افزایش اندازه ذرات بودند [۲۸]. اما بسیاری از پژوهشگران گزارش کردند، فراصوت می‌تواند اندازه توده‌ها و انبوه‌های پروتئینی را کاهش دهد. Wu و همکاران اثر شدت و زمان فراصوت‌دهی را بر پروتئین و چربی‌های شیر همگن نشده بررسی و کاهش اندازه ذرات را در اثر فراصوت‌دهی گزارش کردند [۲۹]. با توجه به نتایج حاصل از پژوهش‌های مختلف می‌توان نتیجه گرفت، فراصوت‌دهی می‌تواند سبب تغییر اندازه ذرات شود که این تغییرات به بسامد و مدت زمان اعمال فراصوت وابسته است.

اثر دما بر اندازه ذرات

نتایج مربوط به اثر دما بر اندازه ذرات نانوکمپلکس‌های ۶ نمونه جدول ۴- میانگین اندازه متوسط ذرات در زمان‌های مختلف فراصوت‌دهی (غلظت سدیم کازئینات در تمام نمونه‌ها ۱٪ است).

پکتین (%w/w)	زمان فراصوت‌دهی (min)	میانگین اندازه ذرات* (nm) ± انحراف معیار
۰/۲	۰	۵۴۵۲ ± ۱۵۵
۰/۲	۱	۶۳۳۱ ± ۴۲۲
۰/۲	۵	۱۶۷۳/۵ ± ۱۵۹
۰/۴۵	۰	۸۱ ± ۳
۰/۴۵	۱	۱۹۶/۵ ± ۱۱
۰/۴۵	۵	۱۲۳/۵ ± ۴
۰/۷	۰	۱۵۸ ± ۴۱
۰/۷	۱	۱۵۸ ± ۴۱
۰/۷	۵	۱۵۸ ± ۴۱

* مربوط به سه تکرار است.

جدول ۶- تحلیل واریانس داده‌های مربوط به دما، غلظت پکتین و زمان فراصوت‌دهی.

منبع	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F-value	p-value
دما	۱	۱۷۸۶۰۲/۷	۱۷۸۶۰۲/۷	۲/۴	۰/۱۴۷
غلظت پکتین	۲	۱/۱۶۳×۱۰۸	۵/۸ × ۱۰۷	۷۸۲/۹	۰/۰۰۰۱
دما × غلظت پکتین	۲	۲۱۳۱۳۵/۴	۱۰۶۵۶۷/۷	۱/۴	۰/۲۷۶
خطا	۱۲	۸۹۱۳۴۰	۷۴۲۷۸/۳	-	-
کل	۱۸	۱/۹۸ × ۱۰۸	-	-	-
زمان	۲	۱/۳۰۹ × ۱۰۷	۶۵۴۳۳۴/۳	۲۳۹/۶۵	۰/۰۰۰۱
غلظت پکتین	۲	۱/۰۲۴ × ۱۰۸	۵/۱۱ × ۱۰۷	۱/۸۷ × ۱۰۳	۰/۰۰۰۱
زمان فراصوت × غلظت پکتین	۴	۲/۳۷ × ۱۰۷	۵۹۳۵۲۶/۵۹	۲۱۷/۳۹	۰/۰۰۰۱
خطا	۱۸	۴۹۱۴۵۲/۶۶	۲۷۳۰۲/۹۲	-	-
کل	۲۷	۲/۲۱۹ × ۱۰۸	-	-	-

×: نشان‌دهنده اثر متقابل است.

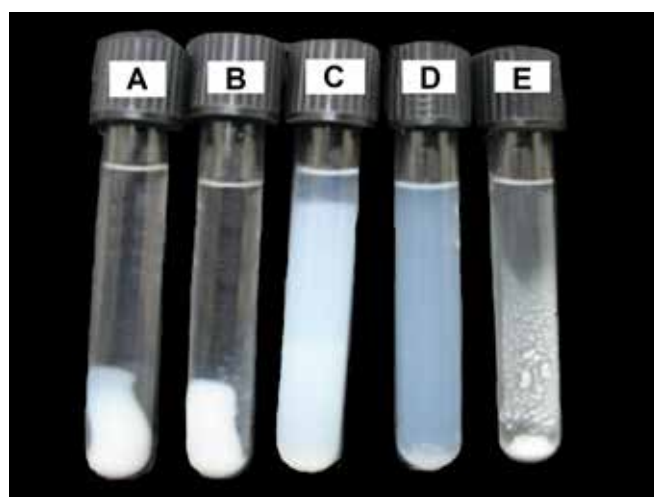
تأثیر قرار می‌دهد. افزایش غلظت نمک، با اثرگذاری بر مقدار نیروی الکتروستاتیک و کاهش آن، سبب بزرگ‌شدن اندازه ذرات و به دنبال آن تشکیل رسوب می‌شود. در این پژوهش، افزودن مقادیر کم نمک بیش از ۰/۰۶ مولار، سبب افزایش توده‌ای شدن و تشکیل رسوب کمپلکس کیتوسان - کازئینات در طول یک شب شد [۳۰].

Jones و همکاران، با بررسی اثر نمک و pH بر اندازه ذرات و رسوب ذرات زیست‌پلیمری بتا-لاکتوگلوبولین و پکتین تشکیل شده طی عمل‌آوری گرمایی، بیان کردند، غلظت نمک بسته به مقدار pH محیط، دارای آثار متفاوتی بر اندازه ذرات، کدورت و سرعت تشکیل

افزون بر این، افزایش قدرت یونی محیط، سبب کاهش بار الکتریکی شده و نیروی دافعه بین ذرات را کاهش می‌دهد. در نتیجه ذرات به هم نزدیک شده و توده‌ای شدن و افزایش اندازه ذرات رخ می‌دهد. اما در مقادیر کم نمک، یون‌های معدنی که از تجزیه نمک در محیط به وجود می‌آیند (قابلیت ایجاد پیوندهای هیدروژنی را ندارند) به دلیل نوع بار سطحی بخشی از مولکول آب را به طرف خود جذب می‌کنند. در این حالت، کمپلکس با یون‌های مخالف احاطه شده و انحلال‌پذیری آن افزایش می‌یابد (پدیده salting in) که در نتیجه پایداری سامانه را نیز افزایش می‌دهد. Anal و همکاران، اثر غلظت نمک روی اندازه ذرات کیتوسان و سدیم کازئینات را در pH برابر ۵/۵ با اندازه‌گیری قطر هیدرودینامیک مخلوط کیتوسان - کازئینات، پس از افزودن مقادیر ۰/۰۶-۰/۰۲ مولار NaCl بررسی کردند. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد، تغییر قدرت یونی محیط، روند تشکیل کمپلکس را تحت

جدول ۷- غلظت نمک‌های استفاده شده برای بررسی اثر نمک بر پایداری سامانه.

تعداد	غلظت نمک (مولاریته)		
	تری‌پتاسیم سیترات	دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات	کلسیم کلرید
A	۱	۰/۱۸	۰/۱۸
B	۰/۷۵	۰/۱۵	۰/۱۵
C	۰/۵	۰/۱	۰/۱
D	۰/۲	۰/۰۸	۰/۰۸
E	۰	۰	۰



شکل ۶- کمپلکس سدیم کازئینات ۱٪ و پکتین ۰/۴۵٪ در pH برابر ۴/۱ حاوی نمک با غلظت‌های مختلف: (الف) ۱، (ب) ۰/۷۵، (ج) ۰/۵، (د) ۰/۲ و (ه) صفر مولار.

بیشتر شود، زیرا با اشباع شدن محلول، پدیده تهی شدن اتفاق افتاده و توده‌ای شدن رخ می‌دهد.

Ron و همکاران، در پژوهشی اثر غلظت پکتین را بر کدورت کمپلکس پکتین و بتا-لاکتوگلوبولین بررسی و گزارش کردند که هر چه غلظت پکتین بیشتر شود، کدورت کمتر می‌شود [۸]. در همین ارتباط، Zimet و همکاران بیان کردند، در مقادیر بسیار کم پکتین، کدورت سامانه به شدت افزایش می‌یابد [۷]. همان‌طور که مشاهده می‌شود، غلظت کازئینات نیز در مقدار کدورت نمونه‌ها مؤثر بوده و افزایش در آن، شفافیت سامانه را کاهش می‌دهد. با توجه به نتایج به دست آمده از بررسی اندازه ذرات، در مقادیر ثابت پکتین (۰/۴۵٪) و pH (۴/۱)، کمترین اندازه ذرات برای کازئینات ۱٪ مشاهده شد. بنابراین انتظار می‌رود، شفاف‌ترین نمونه مربوط به این سامانه باشد. برخلاف انتظار، این نمونه از نمونه ۰/۵٪ کازئینات شفافیت کمتری داشت و می‌توان دلیل آن را به افزایش تعداد کمپلکس‌ها در اثر افزایش غلظت زیست‌پلیمرها نسبت داد.

مطابق نتایج Jones و همکاران، افزایش کدورت محلول‌های بتا-لاکتوگلوبولین - پکتین با کاهش pH از ۵ تا ۳/۵، بیشتر از محلول‌های بتا-لاکتوگلوبولین - کاراگینان بود که به تشکیل تعداد کمپلکس بیشتر در محلول‌های بتا-لاکتوگلوبولین - پکتین نسبت داده شد، چون اندازه ذرات محلول بتا-لاکتوگلوبولین - پکتین کمتر بود [۱۰]. در این باره پژوهشگران معتقدند، نقاط اتصال در شبکه به عنوان ذره جدا عمل کرده و می‌تواند سبب پراکندگی نور و در نتیجه افزایش کدورت شود.

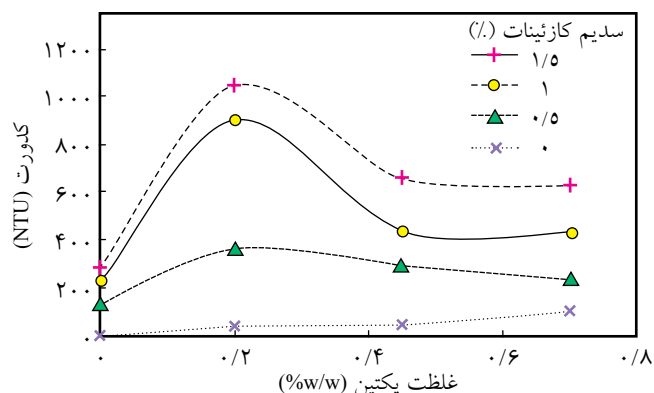
خواص رئولوژیکی نوسانی

در شکل ۸ - الف و ب اثر غلظت‌های مختلف پکتین (۰/۲، ۰/۴۵ و ۰/۷) و سدیم کازئینات (۰/۵، ۱ و ۱/۵) بر مدول‌های گرانروکشسانی سامانه مدل نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، در آزمون پویس بسامد نمونه‌های کمپلکس، با افزایش غلظت پکتین، مدول‌های گرانروکشسانی (G' و G'') افزایش می‌یابند. در تمام نمودارها، مدول اتلاف (G'') از مدول ذخیره (G') بزرگ‌تر است و با افزایش بسامد به هم نزدیک‌تر می‌شوند. این موضوع به دلیل افزایش تداخل و درگیری بین پکتین و کازئین و ایجاد برهم‌کنش‌های الکتروستاتیک قوی‌تر بین آنها در بسامدهای بزرگ‌تر است که منجر به تشکیل ساختارهای قوی‌تری می‌شود [۳۲، ۳۳]. این رفتار به رفتار محلول‌های رقیق شباهت دارد که در آنها توابع گرانروکشسان به بسامد وابسته بوده و با افزایش بسامد مقادیر آنها افزایش می‌یابد [۳۲-۳۴]. افزایش مقدار پکتین در محیط و تشکیل کمپلکس، شعاع

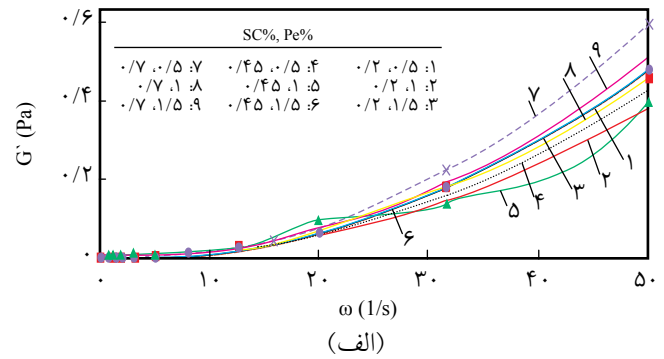
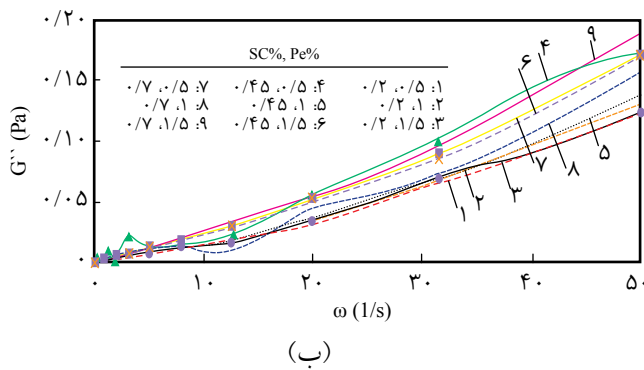
رسوب است. طبق نتایج به دست آمده از این پژوهش، اندازه ذرات کمپلکس در نبود نمک و در محدوده pH برابر ۷-۴، ۱۵۰-۳۰۰ nm بود و با کاهش pH، اندازه ذرات و کدورت سامانه افزایش یافت. همچنین، سرعت تشکیل رسوب در این سامانه به دلیل کاهش بار الکتریکی طی تشکیل کمپلکس افزایش یافت. در حالی که افزودن نمک در این سامانه، پایداری گرمایی آن را افزایش داد و سبب کاهش کدورت، اندازه ذرات و سرعت تشکیل رسوب شد [۱۰]. طی پژوهش‌های انجام شده توسط Matsuda و همکاران معلوم شد، نمک، انحلال‌پذیری کمپلکس مواد فعال سطحی و پلیمر را نیز بهبود می‌بخشد [۳۱].

کدورت

همان‌طور که پیش‌تر گفته شد، کاهش pH در محدوده‌ای خاص، سبب تشکیل کمپلکس و افزایش کدورت سامانه می‌شود. این کدورت با افزایش اندازه ذرات یا افزایش تعداد کمپلکس تشکیل شده بیشتر شد. شکل ۷ اثر غلظت‌های متفاوت پکتین و کازئین را در مقدار کدورت کمپلکس (pH=۴/۱) نشان می‌دهد. زمانی که غلظت پکتین به ۰/۲٪ افزایش یافت، افزایش شدیدی در مقدار کدورت سامانه مشاهده شد، ولی با افزایش بیشتر پکتین، کدورت کاهش یافت. در مقادیر کم پکتین نسبت به سدیم کازئینات (۱٪ و ۱/۵٪)، ممکن است دو حالت عدم پوشش دهی کامل کازئین و توده‌ای شدن ناشی از تشکیل پل رخ دهد. این عوامل موجب افزایش اندازه ذرات، پراکنش نور و در نتیجه افزایش کدورت می‌شود. اگر مقدار پکتین افزایش یابد، دافعه استری و الکتروستاتیکی (افزایش بارهای منفی) افزایش یافته و از نزدیک شدن ذرات کمپلکس به یکدیگر جلوگیری می‌کند. این نتایج با نتایج به دست آمده از آزمون تعیین اندازه ذرات مطابقت داشت. باید توجه داشت، غلظت پکتین نباید از حدی خاص



شکل ۷- اثر غلظت زیست‌پلیمرها بر کدورت سامانه حاوی نانوکمپلکس در pH برابر ۴/۱.



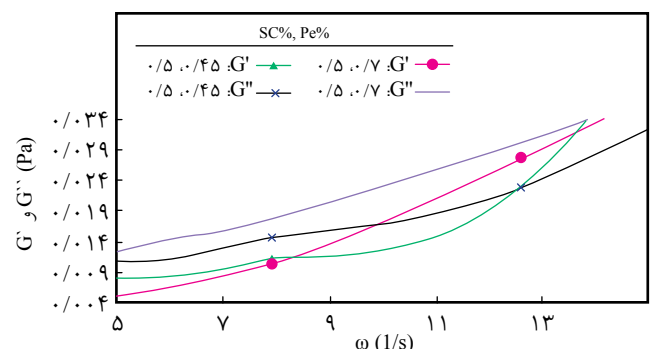
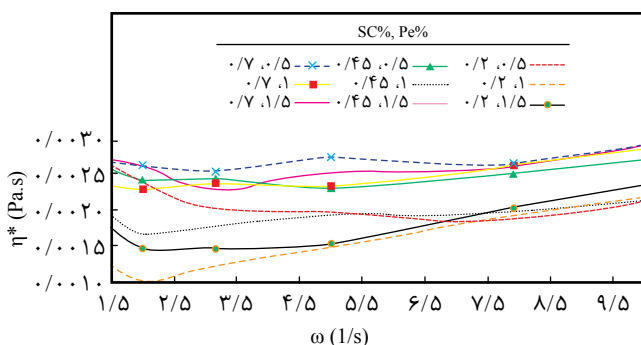
شکل ۸ اثر نسبت‌های مختلف زیست‌پلیمرها بر: (الف) مدول ذخیره و (ب) مدول اتلاف در pH برابر ۱/۴ و در کرنش ثابت ۰/۰۱ درصد.

را در مقایسه با نمونه‌های بدون پکتین افزایش می‌دهد [۳۵]. افزایش بسامد و افزایش غلظت هیدروکلوئید هر دو شبیه به هم عمل کرده و افزایش هر دو موجب افزایش گیرافتادن زنجیرهای زیست‌پلیمرها در محلول می‌شود که در نهایت موجب تشکیل ژل ضعیف می‌شود [۳۶]. شکل ۹ مدول‌های اتلاف و ذخیره مربوط به کمپلکس سدیم کازئینات ۰/۵٪ و دو درصد مختلف پکتین (۰/۴۵٪ و ۰/۲٪) را نشان می‌دهد. با توجه به این شکل مشاهده می‌شود، در غلظت‌های ثابت سدیم کازئینات، افزایش غلظت پکتین نقطه تشکیل ژل را افزایش می‌دهد. این موضوع نشان می‌دهد، پکتین با جلوگیری از به هم پیوستن ذرات به هم، از تشکیل شبکه زلی ممانعت می‌کند. Matia و همکاران نیز در مطالعه روی اثر افزودن پکتین آمیدی شده کم‌استر بر رئولوژی و ریزساختار ژل‌های آمیدی حاصل از سدیم کازئینات، نشان دادند که مدول ذخیره (G') سامانه، با افزایش مقدار پکتین از ۱٪ به ۴٪ (v/w)، شروع به کاهش می‌کند، بنابراین مقدار پکتین اضافی روی تجمع مولکول‌ها و تشکیل شبکه اثرگذار است و در نهایت موجب کاهش مدول کشسانی و سرعت کمتر تشکیل ژل می‌شود [۳۴]. در تمام نمودارها در شکل ۸ - الف و ب

ذرات و بار کلی سطحی ذرات کازئین را افزایش داده (در مقایسه با ذرات کازئین لخته نشده) و باعث افزایش دافعه الکتروستاتیک و در نتیجه افزایش کسر حجمی مؤثر و مدول‌ها می‌شود.

Ercelebi و همکاران نشان دادند، مدول‌های گرانروکشسانی کمپلکس پکتین - پروتئین جدا شده آب پنیر و صمغ گوار - پروتئین جدا شده آب پنیر وابسته به بسامد بوده و رفتار کمپلکس مزبور در بسامدهای کم، به محلول‌های رقیق شباهت دارد. این پژوهشگران همچنین نشان دادند، افزایش غلظت صمغ گوار و پکتین در کمپلکس با ایجاد ساختارهای قوی‌تر، موجب افزایش مدول‌ها شده است [۳۲]. در پژوهشی دیگر Andrews و همکاران نشان دادند، در بسامدهای کم، مدول اتلاف کمپلکس صمغ عربی کیتوسان از مدول ذخیره آن بیشتر است و رفتار کمپلکس مزبور در این بسامد مشابه محلول‌های رقیق است. در این پژوهش، نیز وابسته بودن مدول‌های گرانروکشسانی به بسامد و غلظت زیست‌پلیمر نشان داده شد، به طوری که افزایش بسامد و غلظت صمغ عربی، مدول اتلاف و ذخیره را افزایش داد [۳۳].

طبق یافته‌های Kouame و همکاران اضافه کردن پکتین به شیر اسیدی شده، به طور معنی‌داری خواص رئولوژیکی محصول نهایی



شکل ۱۰ - گرانروی کمپلکس نانوکمپلکس کازئین - پکتین با نسبت‌های مختلف زیست‌پلیمری در pH برابر ۱/۴ و در کرنش ثابت ۰/۰۱ درصد.

شکل ۹ - نقطه تشکیل ژل برای نانوکمپلکس‌های سدیم کازئینات ۰/۵٪ و پکتین ۰/۴۵٪ و ۰/۲٪ در pH برابر ۱/۴ و در کرنش ثابت ۰/۰۱ درصد.

حاصل دارد و کمتر و بیشتر از غلظتی معین، اندازه ذرات افزایش می‌یابد که برای سامانه‌های حامل مطلوب نیست. برای سامانه به‌کار رفته در این پژوهش مقادیر بهینه کازئینات و پکتین به ترتیب ۱ و ۰/۴۵ درصد معین شد. همچنین، عواملی مانند دما، فراصوت‌دهی و غلظت نمک در اندازه و پایداری سامانه کلوئیدی حاصل می‌توانند مؤثر باشند.

قدردانی

از مرکز تحقیقات و توسعه شرکت تکدانه به دلیل پشتیبانی فنی در انجام آزمون‌های رئولوژیکی، پژوهشکده پلیمر دانشگاه سهند و جناب آقای دکتر عباسی برای انجام آزمون‌های DSC و مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز تشکر و قدردانی می‌شود.

مراجع

- Des Rieux A., Fievez V., Garinot M., Schneider Y.J., and Preat V., Nanoparticles as Potential Oral Delivery Systems of Proteins and Vaccines: A Mechanistic Approach, *J. Control. Rel.*, **116**, 1-27, 2006.
- Langer R. and Peppas N.A., Advances in Biomaterials, Drug Delivery and Bionanotechnology, *Am. Ins. Chem. Eng.*, **49**, 2990-3006, 2003.
- Chen L., Remondetto G.E., and Subirade M., Food Protein-based Materials as Nutraceutical Delivery Systems, *Trends Food Sci. Technol.*, **17**, 272-283, 2006.
- Urias-Orona V., Rascón-Chu A., Lizardi-Mendoza J., Carvajal-Millán E., Gardea A.A., and Ramírez-Wong B., A Novel Pectin Material: Extraction, Characterization and Gelling Properties, *Int. J. Mol. Sci.*, **11**, 3686-3695, 2010.
- Lucey J.A., Tamehana M., Singh H., and Munro P.A., Stability of Model Acid Milk Beverage: Effect of Pectin Concentration, Storage Temperature and Milk Heat Treatment, *J. Textur Stud.*, **30**, 305-318, 1999.
- Jensen S., Rolin C., and Ipsen R., Stabilisation of Acidified Skimmed Milk with HM Pectin, *Food Hydrocolloid.*, **24**, 291-299, 2010.
- Zimet P. and Livney Y.D., Beta-lactoglobulin and Its Nanocomplexes with Pectin as Vehicles for w-3 Polyunsaturated Fatty Acids, *Food Hydrocolloid.*, **23**, 1120-1126, 2009.
- Ron N., Zimet P., Bargarum J., and Livney Y.D., Beta-lactoglobulin - Polysaccharide Complexes as Nanovehicles for Hydrophobic Nutraceuticals in Non-fat Foods and Clear Beverages, *Int. Dairy J.*, **20**, 686-693, 2010.
- Ye A., Complexation between Milk Proteins and Polysaccharides via Electrostatic Interaction: Principles and Applications- A Review, *Int. J. Food Sci. Technol.*, **43**, 406-415, 2008.
- Jones W., Decker E.A., and McClements D.J., Thermal Analysis of Beta-lactoglobulin Complexes with Pectins or Carrageenan for Production of Stable Biopolymer Particles, *Food Hydrocolloid.*, **24**, 239-248, 2010.
- Bedie G.K., Turgeon S.L., and Makhlof K., Formation of Native Whey Protein Isolate-Low Methoxyl Pectin Complexes as a Matrix for Hydro-Soluble Food Ingredient Entrapment in Acidic Foods, *Food Hydrocolloid.*, **22**, 836-844, 2008.
- Sadeghi M., Synthesis and Investigation of Swelling Behavior Natural Based Superabsorbent Composites with High Thermal Resistance, *Aust. J. Basic Appl. Sci.*, **5**, 887-895, 2011.
- Dhanasingh S. and Nallaperumal S.K., Chitosan/Casein Microparticles: Preparation, Characterization and Drug Release Studies, *World. Academy. Sci. Eng. Technol.*, **44**, 229-233, 2010.
- Luo Y., Zhang B., Whent M.Y.U.L., and Wang Q., Preparation

- and Characterization of Zein/Chitosan Complex for Encapsulation of α -tocopherol, and Its in Vitro Controlled Release Study, *Colloid. Surfac. B*, **85**, 145-152, 2011.
15. Dudhani A.R. and Kosaraju S.L., Bioadhesive Chitosan Nanoparticles: Preparation and Characterization, *Carbohydr. Polym.*, **81**, 243-251, 2010.
 16. Parveen S., Mitra M., Krishnakumar S., and Sahoo S.K., Enhanced Antiproliferative Activity of Carboplatin-Loaded Chitosan-Alginate Nanoparticles in a Retinoblastoma Cell Line, *Acta Biomater.*, **6**, 3120-3131, 2010.
 17. Kittur F.S., Prashanth K.V.H., Sankar K.U., and Tharanathan R.N., Characterization of Chitin, Chitosan and their Carboxymethyl Derivatives by Differential Scanning Calorimetry, *Carbohydr. Polym.*, **49**, 185-193, 2002.
 18. Paula H.C.B., Sombra F.M., Cavalcante R.D.F., Abreu F.O.M.S., and De Paula R.C.M., Preparation and Characterization of Chitosan/Cashew Gum Beads Loaded with Lippia Sidoides Essential Oil, *Mater. Sci. Eng. C*, **31**, 173-178, 2011.
 19. Zaleska H., Ring S., and Tomasik P., Electrosynthesis of Potato Starch-Whey Protein Isolate Complexes, *Carbohydr. Polym.*, **45**, 89-94, 2001.
 20. Zhang G., Foegeding E.A., and Hardin C.C., Effect of Sulfated Polysaccharides on Heat-Induced Structural Changes in β -Lactoglobulin, *J. Agr. Food. Chem.*, **52**, 3975-3981, 2004.
 21. Capitani C., Pérez O.E., Pacheco B., Teresa M., and Pilosof A.M.R., Influence of Complexing Carboxy Methyl Cellulose on the Thermostability and Gelation of α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin, *Food Hydrocolloid.*, **21**, 1344-1354, 2007.
 22. Huan G.Q., Sun Y.T., Xiao J.X., and Yang J., Complex Coacervation of Soybean Protein Isolate and Chitosan, *Food Chem.*, In Press, 2012.
 23. Pedersen H.C.A. and Jorgensen B.B., Influence of Pectin on the Stability of Casein Solutions Studied in Dependence of Varying pH and Salt Concentration, *Food Hydrocolloid.*, **5**, 323-328, 1991.
 24. Girard M., Turgeon S.L., and Gauthier S.F., Interbiopolymer Complexing between [β]-Lactoglobulin and Low and High-methylated Pectin Measured by Potentiometric Titration and Ultrafiltration, *Food Hydrocolloid.*, **16**, 585-591, 2002.
 25. Marozienne A. and de Kruif C.G., Interaction of Pectin and Casein Micelles, *Food Hydrocolloid.*, **14**, 391-394, 2000.
 26. Syrbe A., Bauer W.J., and Klostermeyer H., Polymer Science Concepts in Dairy System: An Overview of Milk Protein and Food Hydrocolloid Interaction, *Int. Dairy J.*, **8**, 179-193, 1998.
 27. Seshadri R., Weiss J., Hulbert G.J., and Mount J., Ultrasonic Processing Influences Rheological and Optical Properties of High Methoxyl Pectin Dispersions, *Food Hydrocolloid.*, **17**, 192-197, 2003.
 28. Teng M.Y., Lin S.H., and Juang R.S., Effect of Ultrasound on the Separation of Binary Protein Mixtures by Cross Flow Ultrafiltration, *Desalination*, **200**, 280-282, 2006.
 29. Wu H., Hulbert G.J., and mount J.R., Effects of Ultrasound on Milk Homogenization and Fermentation with Yoghurt Starter, *Innov. Food. Sci. Emerg. Technol.*, **1**, 211-218, 2001.
 30. Anal A.K., Tobiassen A., Flanagan J., and Singh H., Preparation and Characterization of Nanoparticles Formed by Chitosan-Caseinate Interactions, *Colloid. Surface. B*, **64**, 104-110, 2008.
 31. Matsuda T. and Annaka M., Salt Effect on Complex Formation of Neutral/Polyelectrolyte Block Copolymers and Oppositely Charged Surfactants, *Langmuir*, **24**, 5707-5713, 2008.
 32. Erçelebi E.A. and Ibanoflu E., Rheological Properties of Whey Protein Isolate Stabilized Emulsions with Pectin and Guar Gum, *Eur. Food. Res. Technol.*, **229**, 281-286, 2009.
 33. Espinosa-Andrews H., Sandoval-Castilla O., Vazquez-Torres H., Vernon-Carter E.J., and Lobato-Calleros C., Determination of the Gum Arabic-Chitosan Interactions by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Characterization of the Microstructure and Rheological Features of their Oacervates, *Carbohydr. Polym.*, **79**, 541-546, 2010.
 34. Matia M.L., Lau K., and Dickinson E., Effects of Low-Methoxyl Amidated Pectin and Ionic Calcium on Rheology and Microstructure of Acid-Induced Sodium Caseinate Gels, *Food Hydrocolloid.*, **18**, 271-281, 2004.
 35. Kouame F.A., Bohoua G., Assemmand F.E., Tano K., and Kouame P.L., Effect of Low Methoxyl Pectin in Acidified Milk Gels, *J. Food Technol.*, **8**, 46-51, 2010.
 36. Ghanarzadeh B., *Principles of Food and Food Biopolymer Rheology*, Tehran University, 2009.