

Sodium Caseinate-Carrageenan Biopolymeric Nanocomplexes as a Carrier of Vitamin D: Study of Complex Formation, Particles Size and Encapsulation Efficiency

Maryam Khoshmanzar^{1,2}, Babak Ghanbarzadeh², Hamed Hamishehkar^{3*}, Mahmud Sowti², Mohammadyar Hoseini⁴

1. Biotechnology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Postal Cod: 51656-65811, Tabriz, Iran
2. Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Postal Cod: 51666-16471, Tabriz, Iran
3. Pharmaceutical Technology Laboratory, Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Postal Cod: 51656-65811, Tabriz, Iran
4. Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Ilam, Postal Cod: 6939177111, Ilam, Iran

Received 4 May 2013, accepted 2 October 2013

ABSTRACT

The protein-polysaccharide complex-based nanocapsule is one type of polymeric nanocarrier which can be potentially useful for encapsulation of hydrophobic nutraceuticals. In this research, caseinate-carrageenan complex was used for encapsulation of vitamin D. The complex formation between caseinate and carrageenan was carried out by lowering the pH under isoelectric point of protein. The Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and differential scanning calorimetry (DSC) confirmed complex formation between carrageenan, caseinate and vitamin D. The particle size of 1% caseinate particles was in the range of 150-300 nanometer and by addition of vitamin D the particle size increased to 450-750 nanometer. Moreover, carrageenan of all concentrations (at constant concentration of caseinate (1%) and pH4.9) resulted in lower particle size below 100 nanometer. The stability of caseinate and its complex formation with carrageenan showed that encapsulation was achieved at 45% efficiency and also vitamin D stability (during 5 days storage) was higher in nanocomplex compared to pure caseinate particles (60-63% compared to 53%). The complex formation between caseinate and carrageenan was carried out by pH decreasing under isoelectric point of protein. The FTIR and DSC confirmed complex formation between carrageenan, caseinate and vitamin D. The particle size of caseinate 1% particles were in the range of 150 -300 nanometer and with adding vitamin D, particle size increased to 450-750 nanometer. Moreover, adding carrageenan at all used concentration (at constant concentration of caseinate (1%) and pH4.9) resulted in reduced particle size to less than 100 nanometer and vitamin D stability (during 5 days storage) was higher (60-63%) in nanocomplex compared to pure caseinate particles (53%).

Keywords:

sodium caseinate-
carrageenan
nanocomplexe,
vitamin D,
infrared spectroscopy,
differential scanning
calorimetry,
encapsulation efficiency

(*)To whom correspondence should be addressed.
E-mail: hamishehkar.hamed@gmail.com

نانوکمپلکس‌های زیست‌پلیمری کاراگینان - سدیم کازئینات به عنوان حامل ویتامین D: بررسی تشکیل کمپلکس، اندازه ذرات و بازده کپسولی شدن

مجله علوم و تکنولوژی پلیمر،
سال بیست و هفتم، شماره ۱،
صفحه ۴۹-۳۷، ۱۳۹۳
ISSN: 1016-3255
Online ISSN: 2008-0883

مریم خوش منظر^۱، بابک قنبرزاده^۲، حامد همیشه‌کار^{۳*}، محمود صوتی^۲، محمدیار حسینی^۴

- ۱- تبریز، دانشگاه علوم پزشکی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، کد پستی ۵۱۶۵۶-۶۵۸۱۱
- ۲- تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکده کشاورزی، گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، کد پستی ۵۱۶۶۶-۱۶۴۷۱
- ۳- تبریز، دانشگاه علوم پزشکی، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، کد پستی ۵۱۶۵۶-۶۵۸۱۱
- ۴- ایلام، دانشگاه ایلام، دانشکده کشاورزی، گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، کد پستی ۶۹۳۹۱۷۷۱۱۱

دریافت: ۹۲/۲/۱۴، پذیرش: ۹۲/۷/۱۰

چکیده

نانوکپسول‌های بر پایه کمپلکس پروتئین - پلی‌ساکارید از انواع نانوحامل‌های زیست‌پلیمری اند که بالقوه می‌توانند برای کپسولی‌شدن مواد غذا - داروی آبگریز استفاده شوند. در این پژوهش، از کمپلکس سدیم کازئینات - کاپاکاراگینان برای کپسولی‌شدن ویتامین D استفاده شد. کمپلکس بین کازئینات و کاراگینان، با افزودن محلول کاراگینان به محلول کازئینی حاوی ویتامین D و کاهش pH به کمتر از نقطه ایزوالکتریک کازئین، تشکیل شد. طیف‌سنجی زیرقرمز تبدیل فوریه (FTIR)، تشکیل کمپلکس بین کازئینات و کاراگینان و ویتامین D را تأیید کرد. تمام پیک‌های موجود در کازئینات، در طیف کازئینات - ویتامین D نیز مشاهده شد، ولی پیک‌های موجود در ۱۶۷۱ و 1526 cm^{-1} به 1650 cm^{-1} و 1571 cm^{-1} منتقل شد. در عدد موجی 1740 cm^{-1} پیک جدیدی مشاهده شد که احتمالاً مربوط به تشکیل گروه استری در اثر واکنش گروه‌های OH ویتامین D با گروه‌های کربوکسیل زنجیرهای جانبی اسیدهای آمینه سدیم کازئینات است. در منحنی DSC کاراگینان، یک پیک گرمازا در دمای $187/3^{\circ}\text{C}$ ، یک پیک گرماگیر چسبیده به آن در دمای $194/9^{\circ}\text{C}$ و نیز یک پیک کوچک گرماگیر در 130°C مشاهده شد. در منحنی DSC کازئینات، یک پیک گرماگیر در 206°C گزارش شد. اتصال ویتامین D به کازئینات موجب افزایش دمای پیک گرماگیر به 246°C شد. اندازه ذرات محلول سدیم کازئینات ۱٪ w/v در محدوده ۱۵۰ nm تا ۳۰۰ nm قرار داشت و با افزودن ویتامین D، به محدوده ۴۵۰ nm تا ۷۵۰ nm افزایش یافت، ولی با افزودن کاراگینان در تمام غلظت‌ها (در غلظت ثابت ۱٪ w/v کازئینات و $\text{pH} = 4/9$) اندازه ذرات به کمتر از ۱۰۰ nm کاهش یافت. سدیم کازئینات و کمپلکس آن با کاراگینان، دارای بازده کپسولی‌شدن حدود ۴۵٪ بود. پایداری ویتامین D طی ۵ روز ننگه‌داری، در نانوکمپلکس سدیم‌کازئینات - کاراگینان، بیشتر از سدیم کازئینات خالص بود (۶۳٪-۶۰٪ در مقایسه با ۵۳٪).

واژه‌های کلیدی

نانوکمپلکس سدیم کازئینات - کاراگینان،
ویتامین D،
طیف‌سنجی زیرقرمز،
گرماسنجی پویایی تفاضلی،
بازده کپسولی‌شدن

مقدمه

کپسولی شدن به فرایندی گفته می‌شود که در آن ماده زیست‌فعال مانند مواد مغذی، طعمی، دارویی، غذا - دارو (nutraceuticals) با ماده دیگری از جنس زیست‌پلیمر، پلیمر سنتزی یا ترکیبات لیپیدی پوشش داده می‌شود [۱]. واژه نانوکپسولی شدن از میکروکپسولی شدن منشأ گرفته است که در سال‌های اخیر برای اهداف مختلف از جمله حفاظت در برابر عوامل بیرونی (نور، گرما، اکسیژن، فلزات سنگین و آنزیم‌ها) و افزایش انحلال‌پذیری در آب و نوشیدنی‌های آبی در صنایع دارویی و غذایی به کار برده می‌شود. ولی، برخلاف میکروکپسولی شدن، ابعاد ذرات در نانوکپسولی شدن کمتر از ۱۰۰ nm هستند [۲-۴]. کاهش اندازه ذرات باعث می‌شود، زیست‌دسترسی‌پذیری و شفافیت محلول‌های حاوی ذرات کم‌محلول در آب، به‌ویژه لیپیدهای ساختاری مانند اسیدهای چرب امگا سه، کارتنوئیدها و ویتامین‌های محلول در چربی بیشتر شود [۳،۵].

ویتامین D جزء ویتامین‌های محلول در چربی دسته‌بندی می‌شود و در ساختار آن، دو پیوند حساس به اکسیژن وجود دارد [۶]. نور، اکسیژن و گرمای زیاد باعث نابودی ویتامین و تشکیل شکل غیرفعال آن می‌شود [۷]. ویتامین D نقش بسیار مهمی در تنظیم کلسیم خون دارد که این کار را با افزایش جذب کلسیم در روده کوچک و کاهش دفع آن از کلیه‌ها انجام می‌دهد.

دریافت روزانه ویتامین D، ۵ μg برای افراد بین ۵۱ - ۲۱ سال و ۱۰ mg برای کودکان و زنان باردار است. اما به دلیل اینکه محلول در چربی است، به‌ندرت در شیر پس‌چرخ و لبنیات کم‌چرب که غنی از فسفات و کلسیم هستند، یافت می‌شود و غنی‌سازی با این ویتامین باعث افزایش دسترسی به آن می‌شود [۸].

انواع مختلفی از پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها می‌توانند برای تولید نانوحامل‌های زیست‌پلیمری به کار روند. اتصال ویتامین D₃ به بخش آبگریز کازئین‌ها، که آنها را در هسته و مرکز پروتئین نگه می‌دارد، می‌تواند غنی‌سازی مواد غذایی کم‌چرب و بدون چربی را آسان کند و آثار عمل‌آوری‌های مختلف را طی فرایند تولید روی ویژگی‌های کاربردی آنها کاهش دهد [۸،۹].

به‌تازگی، استفاده از کمپلکس‌های پروتئین - پلی‌ساکارید در سامانه‌های کپسولی شدن برای تولید نانوحامل‌ها بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. [۱۰-۱۲]. هنگامی که پروتئین و پلی‌ساکارید با هم در محیط مایع مخلوط می‌شوند، دو نوع حالت مختلف سازگاری ترمودینامیکی و ناسازگاری ترمودینامیکی و در نتیجه جدا شدن از هم می‌تواند رخ دهد. بسته به بار الکتریکی موجود روی هر دو زیست‌پلیمر و نیز عوامل مؤثر بر آنها مثل pH و قدرت یونی و اینکه

مخلوط در چه شرایطی باشد، امکان وقوع هر دو وجود دارد.

پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها می‌توانند با ایجاد و غلبه برهم‌کنش‌های جذبی، کمپلکس‌های محلول یا نامحلول تشکیل دهند یا در اثر غلبه برهم‌کنش‌های دفعی و ناسازگاری، در سامانه (محلول) به شکل مجزا قرار گیرند. برهم‌کنش‌های جذبی، بیشتر با ایجاد پیوندهای الکتروستاتیک بین بارهای مخالف زیست‌پلیمرها انجام می‌شود و بین پروتئین‌های با بار مثبت در کمتر از pH نقطه ایزوالکتریک (pH < PI) و پلی‌ساکاریدهای آنیونی (حاوی گروه‌های کربوکسیل، فسفات و سولفات) در pH زیاد pKa یا پروتئین با بار منفی (pH > PI) و پلی‌ساکاریدهای کاتیونی (مانند کیتوسان) رخ می‌دهد [۱۰].

کازئین مهم‌ترین پروتئین شیرنشخوارکنندگان است. این پروتئین، در شیر میسلی‌هایی تشکیل می‌دهد که به عنوان نانوحامل طبیعی عمل می‌کنند. سدیم کازئینات از مشتقات کازئین است که به‌طور صنعتی تهیه می‌شود و کاربردهای فراوانی در صنایع غذایی دارد. کازئین و کازئینات می‌توانند با برهم‌کنش‌های مختلف شامل الکتروستاتیک، هیدروژنی و آبگریز، به پلی‌ساکاریدها متصل شوند. در ضمن، به مواد زیست‌فعال آبگریز مانند ویتامین‌های محلول در چربی با برهم‌کنش‌های آبگریز متصل شوند و آنها را محافظت کنند (به شکل مدل پوسته - هسته) [۴].

از پلی‌ساکاریدهای آنیونی مختلفی می‌توان برای تولید کمپلکس و نانوکپسول استفاده کرد. کاراگینان پلی‌ساکارید خطی با گروه آنیونی قوی سولفات است و ساختار آن شامل واحدهای تکراری D-گالاکتوپیرانوز است که با پیوند گلیکوزیدی ۱α ← ۲ و ۱β ← ۴ به هم متصل شده‌اند. کاپاکاراگینان شامل حلقه ۳ و ۶ انیدرو و یک گروه سولفات است. مطالعات پیشین نشان داد، کاراگینان می‌تواند با پروتئین‌ها برهم‌کنش داده و کمپلکس محلول یا نامحلول تولید کند و به همین دلیل در تولید فرآورده‌های لبنی مانند شیر شکلاتی استفاده می‌شود [۶].

در پژوهش‌های متعددی از نانوکپسول‌های بر پایه زیست‌پلیمر برای تولید نانوحامل‌های ترکیبات فعال آبگریز استفاده شده است [۸،۱۳،۱۴]. Semo و همکاران [۸]، نانوذرات کازئینی را به عنوان نانوحامل برای ویتامین D به کار بردند. آنها اعلام کردند، ابعاد نهایی نانومیسلی‌های کازئینی با این ویتامین و بدون آن به ترتیب ۱۵۰ nm تا ۵۰۰ nm بود که ویتامین D را تا پنج برابر بیشتر نسبت به حالت کپسولی‌نشده آن در برابر تابش محافظت می‌کند.

Zimet و Livney [۱۳] نیز نانوکمپلکس پروتئینی - پلی‌ساکاریدی β-لاکتوگلوبولین - پکتین با هسته اسید چرب امگا سه دکزاگزانوئیک اسید (DHA) را تولید کردند و به مدت ۱۰۰ h در دمای ۴۰°C و شرایط اکسایش قرار دادند. با توجه به نتایج، مشخص شد که فقط

دستگاه‌ها و روش‌ها

تهیه محلول‌های کازئیناتی

پودر سدیم کازئینات با مقادیر مختلف ۰/۵، ۱ و ۱/۵ g در آب دوبار تقطیر ۴°C حل و به منظور حداکثر جذب آب کازئین، به مدت ۸ h در دمای یخچال نگهداری شد. در نهایت، پس از عبور از کاغذ صافی Whatman ۴۰ به کمک پمپ خلأ، محلول به حجم نهایی ۱۰۰ mL رسانده شد.

تهیه محلول‌های کاراگینانی

محلول کاراگینانی با حل کردن غلظت‌های مختلف ۰/۰۱، ۰/۰۲ و ۰/۰۳ % w/v پودر کاراگینان در آب دوبار تقطیر ۸۰°C - ۷۰°C تهیه شد. برای کامل شدن جذب آب، محلول حداقل به مدت ۸ h پیش از استفاده، در یخچال نگهداری شد. تمام محلول‌های استفاده شده روزانه و تازه تهیه شدند.

تهیه محلول حاوی ویتامین D

بدین منظور، ۰/۵ g از ویتامین D در ۵ mL اتانول حل شد. سپس، با فویل آلومینیمی اطراف ظرف حاوی ویتامین D پوشانده شد. شایان ذکر است، مقدار اتانول باید در حدی باشد که در نهایت در کمپلکس نهایی از درصدی مشخص بیشتر نشود. انتخاب مقدار ویتامین D برای افزودن به محلول سدیم کازئینات، بر اساس مقدار نیاز روزانه بود.

تهیه محلول نانوکمپلکس

پس از حل کردن سدیم کازئینات در آب، مقدار ۲۵۰ μL از ویتامین D محلول در اتانول، به محلول کازئینی افزوده و به مدت ۵ min به شدت همزده شد. پس از آن، مقدار ۲ mL نمک تری‌پتاسیم سیترات ۰/۴ مولار و دو محلول نمکی کلسیم کلرید ۰/۰۸ مولار و دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات ۰/۰۸ مولار به ترتیب با مقادیر ۱۰ و ۱۲ mL طی هشت 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 خنثی، محلول‌های کاراگینانی از پیش‌تهیه شده به محلول پروتئینی افزوده شد. تیترکردن تا pH مدنظر با HCl، ۰/۱ نرمال انجام شد. در شکل ۱ طرح کلی تولید نانوکمپلکس سدیم کازئینات - کاراگینان حاوی ویتامین D آمده است.

آزمون طیف‌سنجی زیرقرمز تبدیل فوریه (FTIR)

برای اندازه‌گیری طیف IR از قرص جامد استفاده شد. ابتدا محلول حاوی کمپلکس در فریزر ۸۰°C - منجمد شد. سپس، در دستگاه

۵٪ تا ۱۰٪ کاهش در شرایط کپسولی شده ایجاد شد. در حالی که در شرایطی که این ویتامین محافظت نشده بود، کاهشی حدود ۸۰٪ رخ داد. بنابراین، ایجاد برهم‌کنش‌های الکتروستاتیک و تشکیل کمپلکس بین پکتین کم استر β- لاکتوگلوبولین، نسبت به β- لاکتوگلوبولین به تنهایی، دارای نقش حفاظت‌کنندگی بیشتری نسبت به امگا سه هستند. Ron و همکاران غنی‌سازی نوشیدنی‌های شفاف بدون چربی را با ترکیبات آبرگیز نظیر ویتامین D2 [۱۴] ارزیابی کردند. آنها توانستند این ترکیبات آبرگیز را در نانوذراتی با اندازه ۷۰-۵۰ nm به دام اندازند که از لحاظ الکتروستاتیکی پایدار بودند. این ذرات متشکل از ماده مغذی آبرگیز پوشش‌دار شده با β- لاکتوگلوبولین و پلی‌ساکارید پلی‌آنیونی (LMP) بودند.

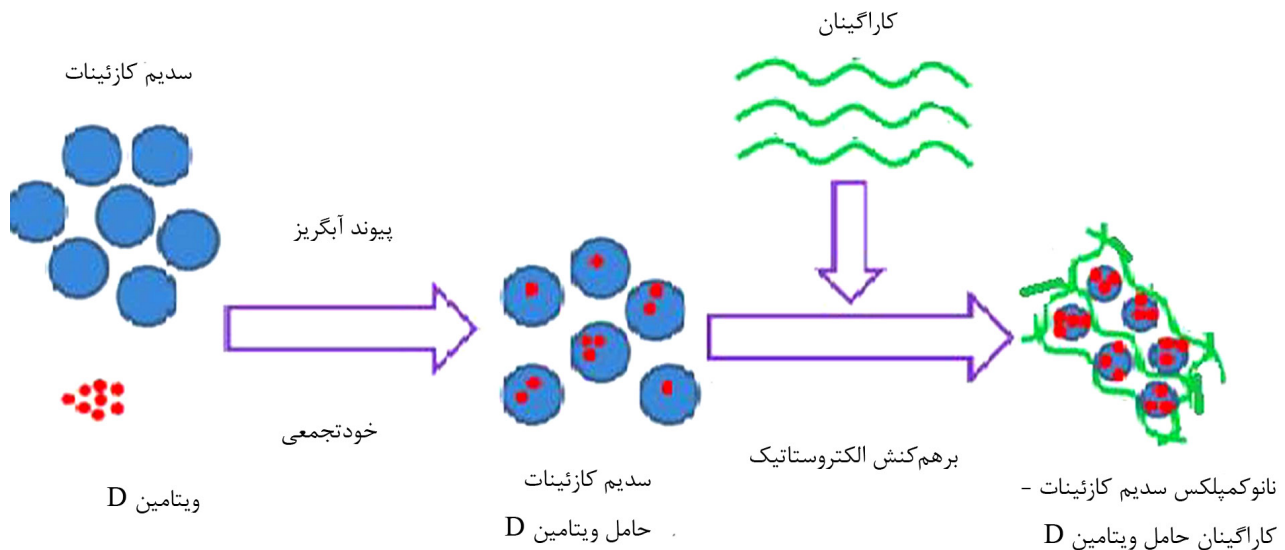
نتیجه مطالعات نشان داد، نانوکمپلکس‌های پکتین - β- لاکتوگلوبولین محافظت بهتری را در برابر تخریب و از بین رفتن این ویتامین نسبت به لایه منفرد پروتئین β- لاکتوگلوبولین ایجاد می‌کنند. همچنین، پایداری بیشتری برای ویتامین موجود در نانوکمپلکس‌ها در محیط آبی، نسبت به ویتامین بدون پوشش پلیمری گزارش شد [۱۴]. Bedie و همکاران [۱۵]، تشکیل کمپلکس‌های پکتین (LMP) و پروتئین مجزا شده آب پنیر (WPI) را برای به‌دام انداختن و حفاظت از تیامین (ترکیب حساس محلول در آب) در غذاهای اسیدی مطالعه کردند و به همین نتایج دست یافتند.

اگرچه نانوکپسول‌های زیست‌پلیمری مختلفی برای کپسولی شدن ترکیبات زیست‌فعال تولید و بررسی شده است، ولی بسیاری از انواع دیگر نیز می‌توانند بالقوه تولید و استفاده شوند. در این پژوهش برای اولین بار، نانوکپسول‌های متشکل از دو نوع زیست‌پلیمر سدیم کازئینات و کاراگینان حاوی ویتامین D تولید و ویژگی‌های کاربردی و بازده کپسولی شدن آن ارزیابی شد.

تجربی

مواد

ویتامین D استفاده شده از شرکت زهراوی و سدیم کازئینات از شرکت DMW هلند خریداری شد. کاراگینان استفاده شده، نوع کاپاکاراگینان بود و از شرکت نگین خوراک پارس خریداری شد. نمک‌های تری‌پتاسیم سیترات، دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات، کلسیم کلرید، کلریدریک اسید، سدیم هیدروکسید، متانول و استونیتریل از شرکت مواد شیمیایی Merck آلمان تهیه شدند.



شکل ۱- طرح کلی تولید نانوکمپلکس سدیم کازئینات-کاراگینان حاوی ویتامین D.

لیزر اندازه‌گیری شد. متوسط اندازه ذرات بر اساس میانگین قطر حجمی معین شد و تمام اندازه‌گیری‌ها برای هر نمونه سه مرتبه تکرار شدند.

تعیین کدورت

کدورت نمونه‌ها با دستگاه طیف‌نورسنج نور مرئی، مدل Ultrospec 2000 معین شد. جذب نمونه در طول موج ۶۰۰ nm اندازه‌گیری و آب دوبار تقطیر به عنوان نمونه شاهد در نظر گرفته شد.

تعیین بازده کپسولی‌شدن و پایداری با رنگ‌نگاری مایع کارآمد (HPLC)

برای تعیین مقدار ویتامین D که با نانوذرات حمل می‌شود، دستگاه RP-HPLC مدل Knaure به کار گرفته شد. برای این کار از ستون C18 (4.6 * 250) استفاده شد. فاز متحرک متانول - استونیتریل با نسبت‌های ۷۰-۳۰ تهیه و با سرعت جریان ۲ mL/min و طول موج ۲۶۰ nm استفاده شد.

برای تهیه منحنی کالیبره‌کردن، ۰/۰۱ g از ویتامین D وزن و در ۱۰ mL استونیتریل - متانول حل شد. بدین ترتیب، محلول مادر (stock) با غلظت ۱۰۰۰ μL/L به دست آمد. از محلول مادر غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰ μL/L تهیه و به دستگاه تزریق شد. سپس، با استفاده از نرم‌افزار Crom Gate، مساحت زیر منحنی برای هر غلظت استاندارد معین شد. سپس با نرم‌افزار Excel، منحنی کالیبره‌کردن غلظت برحسب مساحت زیر منحنی رسم شد که نتایج آن در شکل ۲ آمده است. مرحله آماده‌سازی نمونه به شرح زیر است:

خشک‌کن انجمادی مدل Christ α 1-4 ساخت کشور آلمان به شکل پودر جامد خشک درآمد. روش تهیه قرص بدین ترتیب بود که ابتدا پودر خشک شده انجمادی و پتاسیم برمید با نسبت‌های ۱ به ۱۰ مخلوط و آسیاب شدند. پس از آن، در دستگاه تهیه قرص با استفاده از دستگاه پرس به شکل قرص‌های نازک با ضخامت کمتر از ۱ mm در آمدند. قرص‌های تهیه شده در محدوده عدد موجی $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ و با قدرت تفکیک 4 cm^{-1} در دستگاه FTIR، بررسی شدند.

آزمون گرماسنجی پوشی تفاضلی (DSC)

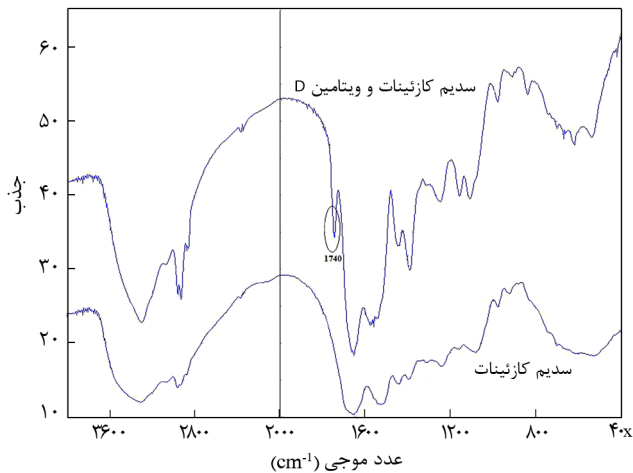
اندازه‌گیری‌های DSC در دستگاه DSC مدل 200F 3 Maia ساخت شرکت NETZSCH آلمان انجام شد. کالیبره‌کردن دستگاه با ایندیم انجام شد. ظرف آلومینیمی خالی به عنوان مرجع استفاده شد. نمونه‌ها با وزن تقریبی ۵ mg با سرعت $30^\circ\text{C}/\text{min}$ در گستره دمایی 20°C تا 300°C پوشش شدند.

آزمون گرماوزن سنجی (TGA)

آزمون گرماوزن‌سنجی با دستگاه Shimadzo ساخت ژاپن در سرعت گرمایش $10^\circ\text{C}/\text{min}$ و در جو هوا انجام شد. وزن نمونه‌ها حدود ۲۰ mg بود.

تعیین اندازه ذرات به روش پراکندگی نور لیزر

توزیع اندازه ذرات و قطر متوسط آنها در دستگاه تجزیه‌گر اندازه ذرات مدل SALD 2101 ساخت ژاپن بر اساس روش پراکندگی نور

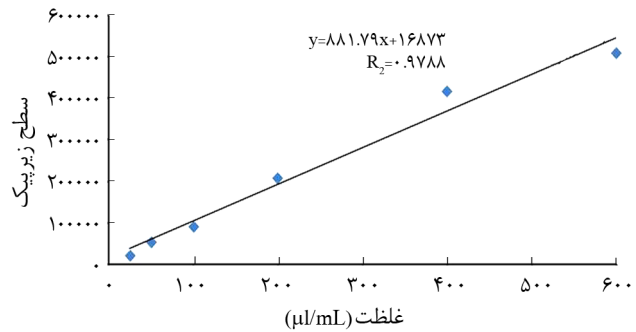


شکل ۳- طیف FTIR مربوط به سدیم کازئینات و سدیم کازئینات حاوی ویتامین D.

خالص، کاراگینان خالص، سدیم کازئینات ۱٪ حاوی ویتامین D و کمپلکس کازئینات سدیم ۱٪ - کاراگینان ۰/۰۳٪ حاوی ویتامین D، استفاده شد. در پروتئین‌ها عدد موجی بین 1200 cm^{-1} تا 1700 cm^{-1} مربوط به آمیدهای ۱، ۲ و ۳ است و هنگامی که پلی‌ساکارید به پروتئین متصل می‌شود با گروه‌های بنیادین روی پروتئین همچون NH_2 آزاد، NH ، گروه‌های فنولی تیروزین و تیول سیستئین وارد واکنش می‌شود.

با توجه به شکل ۳، پیوندهای هیدروژنی NH -مربوط به سدیم کازئینات و پیوندهای هیدروژنی درون‌مولکولی گروه‌های OH -کاراگینان، پیک بزرگی در محدوده عددهای موجی 3300 cm^{-1} - 3100 cm^{-1} نشان می‌دهد. در این محدوده پهن بودن پیک، پیوندهای هیدروژنی قوی در ترکیب را نشان می‌دهد، پیک‌های مربوط به عدد موجی محدوده 3300 cm^{-1} - 3100 cm^{-1} در نمونه کمپلکس، باریک‌تر شده و به سمت راست متمایل شده است. تیز شدن پیک در این منطقه تشکیل پیوندهای هیدروژنی ضعیف‌تری را در حالت تشکیل کمپلکس نشان می‌دهد. تمام پیک‌های موجود در کازئینات، در طیف کازئینات - ویتامین D نیز مشاهده می‌شود، ولی پیک‌های موجود در 1671 cm^{-1} و 1526 cm^{-1} (اولی مربوط به آمید ۱ و دومی مربوط به آمید ۲ است) به 1650 cm^{-1} و 1571 cm^{-1} منتقل شده است. در عدد موجی 1740 cm^{-1} پیک جدیدی دیده می‌شود که احتمالاً مربوط به تشکیل گروه استری در اثر واکنش گروه‌های OH ویتامین D با گروه‌های کربوکسیل زنجیرهای جانبی اسیدهای آمینه سدیم کازئینات است.

مطالعه Ifiön و همکاران [۱۷]، درباره بررسی ویژگی‌های تغذیه‌ای شیر کامل به روش‌های طیف‌سنجی زیرقرمز مشخص شد که گروه آمید پروتئین در 1546 cm^{-1} و گروه هیدروکسیل لاکتوز در عدد



شکل ۲- منحنی استاندارد ویتامین D.

از ۲ mL از محلول سدیم کازئینات حاوی ویتامین D و نانوکمپلکس کازئینات - کاراگینان حاوی ویتامین D تهیه شد. سپس ۲ mL اتانول و ۴ mL هگزان به محلول‌ها اضافه شد. پس از آن، نمونه‌ها در دستگاه مرکزگریز با سرعت ۴۰۰۰ rpm، قرار داده شدند. سطح رویی جمع‌آوری و داخل میکرولوله‌های ۲ mL ریخته شد. پس از آن، به کمک گاز نیتروژن، نمونه‌ها خشک شدند. محلول باقی‌مانده داخل فاز متحرک حل و سپس نمونه به ستون تزریق شد. با مقایسه پیک‌های حاصل و زمان بازداری مربوط با مقادیر متناظر ویتامین D استاندارد، شناسایی و مقادیر کمی آنها با مقایسه مساحت زیر پیک ویتامین D نمونه و استاندارد داخلی معین شد. برای محاسبه بازده کپسولی شدن از معادله‌های (۱) و (۲) استفاده شد:

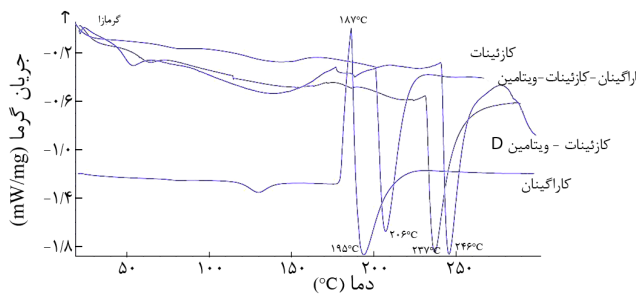
$$(1) \times 100 = \frac{\text{مقدار بارگذاری نشده} - \text{مقدار اولیه}}{\text{مقدار اولیه افزوده شده}} \times 100 = \text{بازده کپسولی شدن}$$

$$(2) \times 100 = \frac{\text{مقدار نهایی کپسولی شدن}}{\text{مقدار اولیه کپسولی شدن}} = \text{پایداری ویتامین D}$$

نتایج و بحث

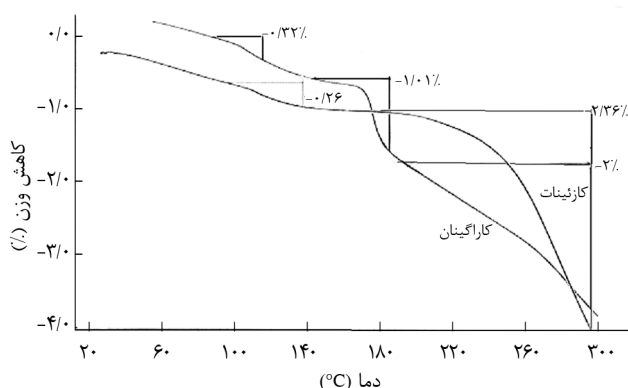
طیف‌سنجی زیرقرمز (FTIR)

آزمون طیف‌سنجی زیرقرمز، برای شناسایی و تشخیص تشکیل کمپلکس بین کاراگینان و سدیم کازئینات و کپسولی شدن ویتامین D در سدیم کازئینات استفاده شد. با توجه به اینکه در طیف‌سنجی زیرقرمز، هر گروه عاملی، بسامد و عدد مشخصی از پرتو زیرقرمز را جذب می‌کند، این طیف‌ها تشخیص گروه‌های شیمیایی اصلی در پلی‌ساکاریدها و پروتئین‌ها و تغییر و تشکیل برهم‌کنش‌های جدید را میسر می‌سازد [۱۶]. برای طیف‌سنجی از نمونه سدیم کازئینات

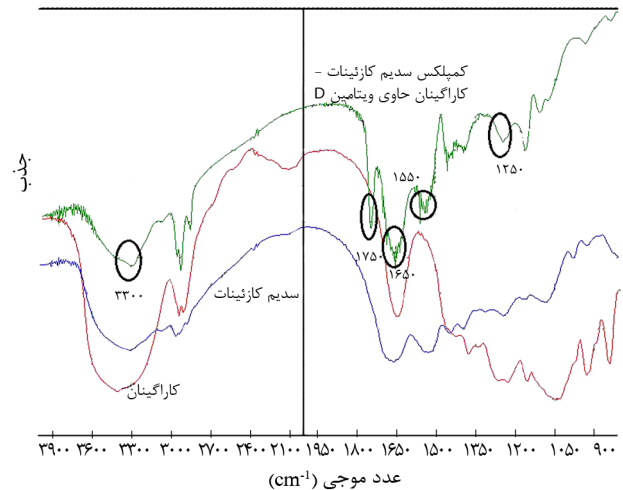


شکل ۵- دمانگاشت DSC سدیم کازئینات، کاپا کاراگینان، سدیم کازئینات حاوی ویتامین D و کمپلکس سدیم کازئینات- کاراگینان حاوی ویتامین D.

می‌توان به ذوب کازئین یا تخریب گرمایی آن نسبت داد. با توجه به نتایج آزمون TGA کازئینات (شکل ۶) کاهش وزن قابل توجهی در دماهای ۲۰۰°C تا ۳۰۰°C رخ می‌دهد که می‌تواند به تخریب گرمایی آن نسبت داده شود. مطابق گزارش Qingzhi و همکاران [۱۸]، در منحنی مشتقات کازئین، یک پیک گرمزا در ۲۷۵°C تا ۲۰۰°C مشاهده می‌شود که به تخریب گرمایی آن نسبت داده شد. در منبعی دیگر، دمای شروع تخریب فیلم خالص کازئیناتی ۲۹۵°C تا ۳۰۰°C گزارش شده است که وجود نرم‌کننده سوربیتول این دما را به علت شکستن برهم‌کنش‌های بین و درون‌زنجیری کاهش داده است [۱۹]. در منحنی DSC کاراگینان، یک پیک گرمزا در دمای ۱۸۷°C، یک پیک گرماگیر چسبیده به آن در دمای ۱۹۴/۹°C و نیز یک پیک کوچک گرماگیر در ۱۳۰°C مشاهده می‌شود. مطابق گزارش Vincekovic و همکاران [۲۰]، کاپا کاراگینان در دمای نزدیک به ۱۸۵°C، یک پیک گرمزا نشان می‌دهد که می‌تواند به تجزیه گرمایی جزئی آن مربوط باشد و نزدیک این پیک گرمزا، در دمای ۱۷۵°C یک پیک گرماگیر کوچک مشاهده شد که به T_g نسبت داده شد. Sankalia و همکاران [۲۱] نیز



شکل ۶- دمانگاشت TGA سدیم کازئینات و کاپا کاراگینان.



شکل ۴- طیف FTIR سدیم کازئینات، کاراگینان و کمپلکس سدیم کازئینات ۱٪ - کاراگینان ۰.۳٪/۰.۳٪ حاوی ویتامین D.

موجی 1039 cm^{-1} دیده می‌شود. همچنین، در لپید دو طیف دیده می‌شود، به طوری که بخش گلیسرولی در عدد موجی $1742/3\text{ cm}^{-1}$ و زنجیر آلکانی اسید چرب در عدد موجی 2873 cm^{-1} جذب نشان می‌دهد. این نتایج با مطالعات حاضر که در عدد موجی 1740 cm^{-1} پیک دیده می‌شود و مربوط به ویتامین D است، مطابقت دارد. در مرحله بعد، نانوکمپلکس نهایی حامل ویتامین بررسی شدند. با توجه به شکل ۴ که مربوط به طیف‌سنجی زیرقرمز نانوکمپلکس کازئینات سدیم ۱٪ - کاراگینان ۰.۳٪/۰.۳٪ حاوی ویتامین D در pH برابر ۴/۹ است، در کمپلکس نهایی نیز پیک در عدد موجی 3300 cm^{-1} وجود دارد که مربوط به پیوند هیدروژنی است. همچنین، پیک در عدد موجی 1750 cm^{-1} که مربوط به ویتامین D است، مجدداً در کمپلکس نهایی وجود دارد. پیک‌ها در اعداد موجی 1650 cm^{-1} و 1550 cm^{-1} مربوط به گروه آمید سدیم کازئینات است که به مقدار جزئی از موقعیت خود در سدیم کازئینات به 1526 cm^{-1} و 1671 cm^{-1} جابه‌جا شده‌اند. پیک در عدد موجی 1221 cm^{-1} که مربوط به گروه سولفات کاراگینان است، نیز از 1221 cm^{-1} به 1250 cm^{-1} جابه‌جا شده است. تغییر جزئی در موقعیت پیوندها، می‌تواند نشان‌دهنده برهم‌کنش الکتروستاتیک بین گروه‌های عاملی NH_3^+ سدیم کازئینات و SO_3 کاراگینان باشد.

بررسی خواص گرمایی

گرماسنجی پویشی تفاضلی (DSC) برای اطمینان از تشکیل کمپلکس بین سدیم کازئینات - ویتامین D و کمپلکس سدیم کازئینات - کاراگینان - ویتامین D انجام شد (شکل ۵). در منحنی DSC سدیم کازئینات خالص پیک گرماگیر در دمای $206/300\text{ C}$ دیده می‌شود که

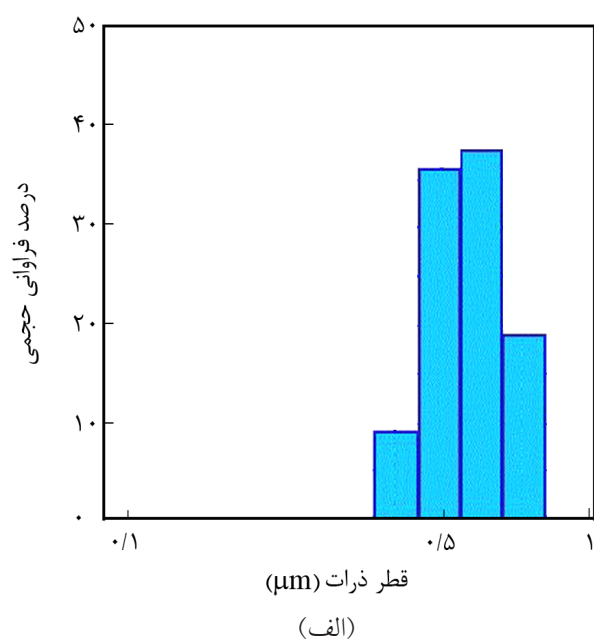
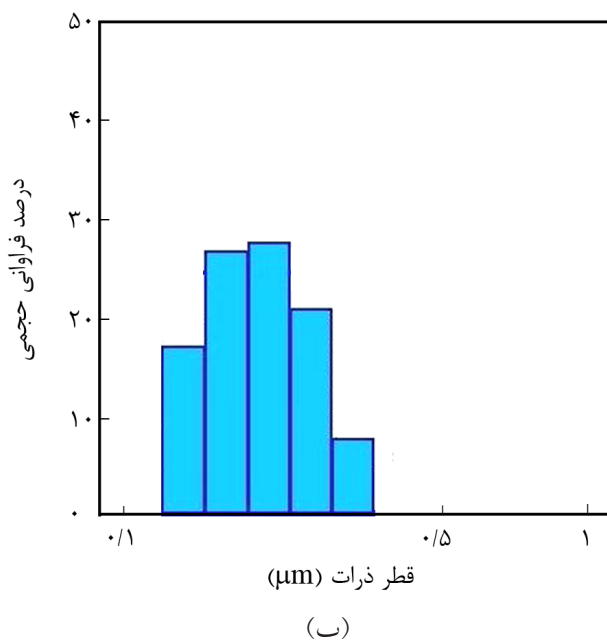
به زیست‌پلیمر حامل، در سایر پژوهش‌ها نیز گزارش شده است. Dudhani و Kosarajul [۲۲] در بررسی خواص گرمایی کیتوسان حامل کاتکین (ترکیب پلی‌فنولی)، مشاهده کردند که با اتصال کاتکین به نانوذرات کیتوسان، دمای ذوب کیتوسان از 125°C به 139°C افزایش یافت که احتمالاً به دلیل افزایش اتصالات هیدروژنی به دلیل وجود ترکیب فنولی کاتکین است.

بررسی اندازه ذرات

اندازه ذرات کپسول، نقش مهمی در پایداری، دسترسی و فعالیت زیستی و خواص ظاهری و ارگانولپتیکی محلول‌های حاوی آن دارد. هر چه مقدار این ذرات کوچک‌تر باشند، این خواص مطلوب‌تر خواهند بود. همان‌طور که در شکل ۷ آمده است، اندازه ذرات محلول سدیم کازئینات ۱٪ در محدوده 150 nm تا 300 nm قرار دارد. در حالی که با افزودن ویتامین D، اندازه ذرات به محدوده 450 nm تا 750 nm افزایش یافته است. در پژوهش‌های سایر پژوهشگران نیز نتایج مشابهی دیده شده است. Ron و همکاران [۱۴] در پژوهش روی نانوکمپلکس β -لاکتوگلوبولین - پکتین به عنوان حامل ویتامین D، اندازه ذرات در محلول خالص β -لاکتوگلوبولین را 12 nm و در مجاورت ویتامین D، 56 nm گزارش کردند. آنها این افزایش اندازه ذرات را به تجمع پروتئین پس از افزودن ویتامین D نسبت دادند. Relkin و Shukat [۲۳] β -لاکتوگلوبولین را به عنوان حامل α -توکوفرول

یک پیک گرمایر پهن در دمای 85°C گزارش کردند که به تبخیر آب نسبت دادند. همچنین، چند پیک گرمازا در دماهای 259 ، 266 و 344°C مشاهده کردند که آنها را به تخریب گرمایی نسبت دادند. با توجه به اینکه خواص گرمایی ترکیب کاراگینان بسته به تعداد و محل گروه سولفات می‌تواند تا حدی متفاوت باشد، این تفاوت‌ها در مکان پیک‌ها را می‌توان توجیه کرد. در پژوهش حاضر، احتمالاً پیک گرمازا و پیک بزرگ گرمایر متصل به آن را می‌توان به تخریب جزئی کاراگینان مربوط دانست و پیک کوچک موجود در دمای 130°C را نیز می‌توان به خروج آب یا مواد فرار نسبت داد. نتایج آزمون TGA نیز نشان می‌دهد، در دماهای 160°C تا 185°C کاهش وزن قابل توجهی رخ داده است. همچنین کاهش وزن جزئی در دماهای 100°C تا 120°C قابل مشاهده است.

در دمانگاشت محلول سدیم کازئینات ۱٪ - ویتامین D، پیک گرمایر از دمای 206°C که مربوط به کازئینات سدیم است به 246°C افزایش یافته است که نشان‌دهنده افزایش پایداری گرمایی کازئینات در اثر اتصال به ویتامین D است. ویتامین D ترکیبی آبریز است که می‌تواند موجب افزایش برهم‌کنش‌های آبریز و اندروالسی در کازئین شود. در منحنی گرمایی کمپلکس سدیم کازئینات - کاراگینان حامل ویتامین D، پیک گرمایر در دمای 237°C مشاهده می‌شود که نشان‌دهنده کاهش دمای تخریب در اثر افزودن کاراگینان است. تغییر پیک‌های گرمایی با اتصال ماده فعال



شکل ۷- توزیع اندازه ذرات: (الف) محلول سدیم کازئینات ۱٪ و (ب) سدیم کازئینات ۱٪ - ویتامین D.

ضروری DHA، با افزایش پکتین از ۰/۳۷۵٪ به ۰/۱۲۵٪ در محلول ۱۱۰ nm و ۰/۲٪ از β -لاکتوگلوبولین، کاهش یافت و به ۱۱۰ رسید. آنها اعلام کردند، به دلیل دافعه الکتروستاتیک و استری زیاد، توده شدن پروتئین کاهش می‌یابد و ذرات کوچک‌تر تولید می‌شوند. همچنین با توجه به جدول ۲، با افزایش غلظت سدیم کازئینات در غلظت ثابتی از کاراگینان ۰/۰۳، اندازه ذرات حاوی ویتامین D، افزایش می‌یابد. علت این افزایش، احتمالاً کافی نبودن مقدار کاراگینان برای پوشش دادن پروتئین است. این پژوهش با نتایج Luo و همکاران [۲۴] مطابقت دارد که با افزایش غلظت پروتئین زئین به ۲۰ mg/mL، اندازه ذرات بزرگ‌تر شد، به طوری که در غلظت ۵ mg/mL تا ۱۵ mg/mL زئین، اندازه ذرات در حدود ۳۵۰ nm بود، ولی با افزایش غلظت زئین به ۲۰ mg، اندازه ذرات به ۵۴۷ nm افزایش یافت. این پژوهشگران بیان کردند، با افزایش غلظت زئین، احتمال تجمع و توده شدن پروتئین‌ها افزایش می‌یابد.

بررسی کدورت

باتوجه به اینکه کدورت محلول‌های کلئیدی بستگی به اندازه ذرات و تعداد ذرات و ضریب شکست ذرات دارد. بررسی کدورت محلول‌ها نه تنها می‌تواند تشکیل کمپلکس را نشان دهد (چون با تشکیل کمپلکس کدورت افزایش می‌یابد) بلکه می‌تواند نشان دهد، اندازه ذرات و تعداد آنها در چه وضعیتی بیشتر یا کمتر است. نتایج حاصل از کدورت چهار محلول سدیم کازئینات ۱٪ خالص، کمپلکس سدیم کازئینات ۱٪ - کاراگینان ۰/۰۱٪، سدیم کازئینات ۱٪ - ویتامین D، کمپلکس سدیم کازئینات ۱٪ - کاراگینان ۰/۰۱٪ - ویتامین D در شکل ۸ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد، کدورت محلول‌های حاوی کازئینات خالص کمتر از محلول‌های کمپلکس است. با توجه به نتایج اندازه ذرات، افزایش کدورت در محلول‌های کمپلکس می‌تواند به علت بیشتر بودن تعداد ذرات و نه اندازه ذرات باشد. ویتامین D محلول در اتانول، کاملاً شفاف است، ولی با افزودن ویتامین به محلول سدیم کازئینات، کدورت محلول افزایش یافت. بررسی

جدول ۲- نتایج اندازه ذرات کازئینات- کاراگینان حاوی ویتامین D در مقدار ثابت کاراگینان (۰/۰۳٪) در pH برابر ۴/۹.

اندازه حجمی ذرات (nm)	pH	کاراگینان	سدیم کازئینات
۷۴/۵ ± ۰/۴۵	۴/۹	۰/۰۳	۰/۵
۷۸/۵ ± ۰/۲۵	۴/۹	۰/۰۳	۱
۴۷۲ ± ۰/۵	۴/۹	۰/۰۳	۱/۵

استفاده کردند. در این پژوهش، اندازه ذرات β -لاکتوگلوبولین ۱۸۳ nm گزارش شد که با افزودن β -توکوفرول به ۳۱۴ nm افزایش یافت. همچنین آنها گزارش کردند، استفاده از فشار باعث کاهش اندازه ذرات می‌شود که در این پژوهش استفاده از فشار ۳۰۰ bar موجب کاهش اندازه ذرات از ۳۱۴ nm به ۲۹۳ nm شد. اندازه این ذرات با افزایش فشار از ۳۰۰ bar به ۱۲۰۰ bar موجب کاهش اندازه ذرات از ۲۹۳ nm به ۱۲۷ nm شد.

در تضاد با پژوهش‌های گفته شده، مطابق پژوهش‌های Semo و همکاران [۸]، طی استفاده از سدیم کازئینات به عنوان حامل مواد فعال آبگریز، اندازه ذرات سدیم کازئینات در محدوده ۵۰ nm تا ۵۰۰ nm مشاهده شد که افزودن ویتامین D اثر چندانی بر اندازه ذرات نداشت. نتایج اندازه ذرات کمپلکس سدیم کازئینات ۱٪w/v و کاراگینان (۰/۰۱، ۰/۰۲ و ۰/۰۳ w/v)، حاوی ویتامین D، در pH برابر ۴/۹ در جدول ۱ آمده است. نتایج نشان می‌دهد، در تمام غلظت‌های کاراگینان، در غلظت ثابتی از کازئینات (۱٪) و pH برابر ۴/۹، اندازه ذرات کمتر از ۱۰۰ nm است. این بدین معنی است که در غلظت ۱٪ کازئینات، غلظت ۰/۰۱٪ کاراگینان برای پوشش‌دهی ذرات پروتئینی کافی بوده است. از سوی دیگر، اندازه ذرات کمپلکس کازئینات - کاراگینان حاوی ویتامین D، نسبت به کازئینات ۱٪ - ویتامین D، که تقریباً ۵۰۰ nm بود، کمتر است که احتمالاً به دلیل برهم‌کنش الکتروستاتیک با کاراگینان، افزایش نیروی دافعه و در نتیجه جلوگیری از انبوهش ذرات است (جدول ۲).

این نتایج با پژوهش Luo و همکاران [۲۴] درباره استفاده از زئین - کیتوسان به عنوان حامل α -توکوفرول مطابقت دارد. آنها نشان دادند، با افزودن کیتوسان، اندازه ذرات از ۸۰۰ nm در ذرات بدون کیتوسان به ۳۶۴ nm در مجاورت کیتوسان کاهش می‌یابد. ولی، با افزایش غلظت کیتوسان، دوباره اندازه ذرات به ۸۰۰ nm می‌رسد که دلیل آن را تشکیل کمپلکس‌های غلیظ‌تر و متراکم‌تر در غلظت‌های بیشتر کیتوسان بیان کرده‌اند. در مطالعات Livney و Zimet [۱۳] اندازه ذرات کمپلکس β -لاکتوگلوبولین - پکتین حامل اسید چرب

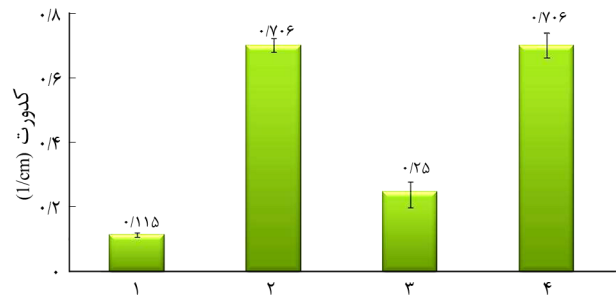
جدول ۱- نتایج اندازه ذرات کازئینات- کاراگینان در مقادیر ثابت سدیم کازئینات (۱٪) حاوی ویتامین D در pH برابر ۴/۹.

اندازه حجمی ذرات (nm)	pH	کاراگینان	سدیم کازئینات
۷۶ ± ۰/۰۲	۴/۹	۰/۰۱	۱
۷۶/۵ ± ۰/۵	۴/۹	۰/۰۲	۱
۷۸/۵ ± ۰/۲۵	۴/۹	۰/۰۳	۱

ویتامین D و محلول کمپلکس سدیم کازئینات ۱٪-کاراگینان ۰/۰۳٪- ویتامین D، بودند. با توجه به پیک حاصل در دقیقه ۱۱ مشخص شد، اولاً کازئینات سدیم قابلیت حفظ ویتامین D را دارد. ثانیاً سطح زیر منحنی برای اتانول حاوی ویتامین و محلول سدیم کازئینات ۱٪ حاوی ویتامین، به ترتیب ۲۵۰ و ۱۱۲ $\mu\text{L/mL}$ و بازده کپسولی شدن ویتامین D داخل سدیم کازئینات حدود ۵۰٪ بوده است.

در پژوهش انجام شده توسط Zimet و Livney [۱۳] مقدار DHA کپسولی شده در کمپلکس β -لاکتوگلوبولین - پکتین، ۶۴٪ مقدار افزوده شده به دست آمد. این پژوهشگران بیان کردند، تمایل DHA به β -لاکتوگلوبولین، ۱۶۶ برابر محیط سرمی است. در پژوهش انجام شده توسط Ron و همکاران [۱۴]، مقدار ویتامین D2 موجود در کمپلکس β -لاکتوگلوبولین - پکتین، ۷۷/۲۶ mg/mL به دست آمد که ۵۵ برابر محیط سرمی بود. Luo و همکاران [۲۴] طی پژوهشی نشان دادند، با افزایش غلظت زئین - کیتوسان حاوی α -توکوفرول، درصد کپسولی شدن از ۷۶/۵٪ به ۸۶/۵٪ افزایش یافت. همچنین بیان کردند، افزودن مقادیر بیشتر α -توکوفرول از ۱۰٪ به ۳۰٪ به محلول حاوی کمپلکس زئین-کیتوسان، بازده کپسولی شدن از ۸۷/۷٪ به ۸۱/۳٪ کاهش می‌یابد. این پدیده در سایر ماتریس‌های پلیمری که حاوی درصد زیاد کپسولی شدن هستند، نیز مشاهده شد و بازده کپسولی شدن را کاهش داد. آنها همچنین نشان دادند، بین بازده کپسولی شدن نانوذرات زئین α -توکوفرول و کمپلکس زئین-کیتوسان α -توکوفرول، اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. زیرا، α -توکوفرول پیش از افزودن کیتوسان به عنوان پوشش‌دهنده، در ساختار زئین قرار می‌گیرد.

پس از محاسبه بازده کپسولی شدن، پایداری ویتامین D در نمونه‌ها پس از پنج روز ارزیابی شد. نتایج مربوط به رنگ‌نگاری نمونه‌ها در جدول ۳ آمده است. بدین ترتیب، با توجه به نتایج در نمونه سدیم کازئینات، حدود ۵۰٪ آن از بین رفته است. در نمونه محلول کمپلکس سدیم کازئینات ۱٪ - کاراگینان ۰/۰۱٪، مقدار نابودی ویتامین به ۴۰٪ کاهش یافته و محلول کمپلکس سدیم کازئینات ۱٪ - کاراگینان



شکل ۸- نتایج کدورت‌سنجی: (۱) سدیم کازئینات ۱٪، (۲) کمپلکس کازئینات - کاراگینان با نسبت‌های ۱-۰/۰۱ و $\text{pH} = 4/9$ ، (۳) سدیم کازئینات ۱٪ حاوی ویتامین و (۴) کمپلکس کازئینات- کاراگینان با نسبت‌های ۱-۰/۰۱ و $\text{pH} = 4/9$ حاوی ویتامین.

کدورت محلول سدیم کازئینات حاوی ویتامین D، نشان می‌دهد، افزایش جزئی کدورت از ۰/۱۱۵ به ۰/۳ رخ داده است که این به دلیل افزایش جزئی اندازه ذرات در مجاورت ویتامین D است. ولی، کدورت کمپلکس نهایی حاوی ویتامین، مشابه کمپلکس کازئینات سدیم - کاراگینان است.

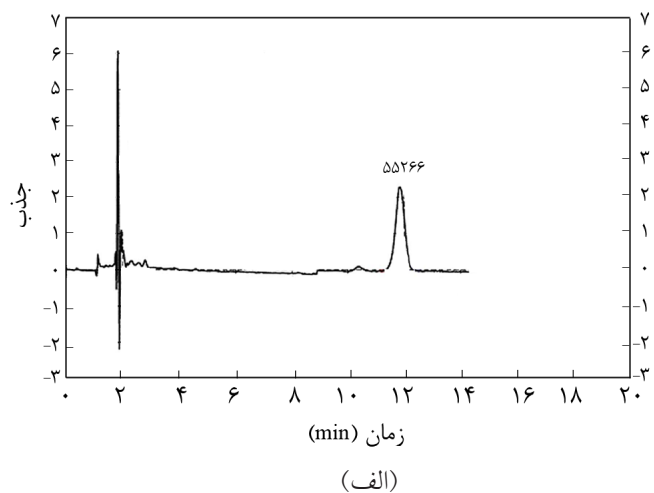
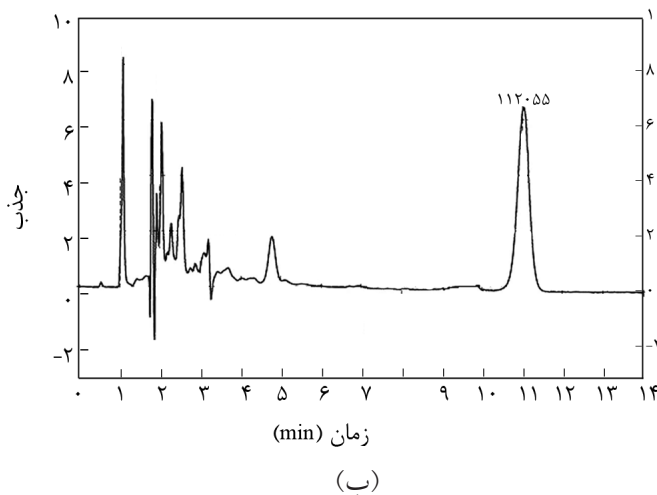
Liang و همکاران [۲۵] در کمپلکس β -لاکتوگلوبولین - α -توکوفرول نیز نتایج مشابهی به دست آوردند. بدین ترتیب که محلول α -توکوفرول در اتانول کاملاً شفاف است و جذب آن به صفر تمایل دارد، اما افزودن $100 \mu\text{mol}$ از α -توکوفرول به $20 \mu\text{mol}$ از β -لاکتوگلوبولین باعث افزایش جزئی کدورت می‌شود. آنها بیان کردند، افزایش کدورت نشان می‌دهد، α - توکوفرول و β - لاکتوگلوبولین باهم کمپلکس محلول در آب تولید کرده‌اند.

بازده کپسولی شدن و پایداری (نتایج حاصل از رنگ‌نگاری فاز معکوس)

برای ارزیابی مقدار بارگذاری ویتامین D در کپسول‌های زیست‌پلیمری، نمونه‌های حاوی ویتامین D به دستگاه تزریق شدند. نمونه‌ها شامل اتانول حاوی ویتامین D (نمونه شاهد)، محلول سدیم کازئینات ۱٪- ویتامین D، محلول کمپلکس سدیم کازئینات ۱٪- کاراگینان ۰/۰۱٪ -

جدول ۳- نتایج آزمون رنگ‌نگاری و مقادیر بازده کپسولی شدن و پایداری.

نمونه	سدیم کازئینات (%)	کاراگینان (%)	مقدار کپسولی شدن ($\mu\text{L/mL}$)	بازده کپسولی شدن (%)	مقدار باقی‌مانده پس از ۵ روز ($\mu\text{L/mL}$)	پایداری پس از ۵ روز (%)
۱ (شاهد)	-	-	۲۵۰	-	۵۰/۴۸	۲۰/۱۹
۲	۱	-	۱۱۲/۸۵	۴۵/۱	۶۰	۵۳/۱۶
۳	۱	۰/۰۱	۱۱۱/۸۵	۴۴/۷	۶۰/۷۸	۶۰/۵۹
۴	۱	۰/۰۳	۱۱۱/۸۵	۴۴/۷	۷۰/۵۰	۶۳/۰۳



شکل ۹- رنگ‌نگاشت: (الف) نمونه استاندارد و (ب) کازئینات ۱٪.

خودتجمعی کازئینی را به عنوان حامل اسیدهای چرب امگا سه انتخاب کردند. نانوذرات کازئینی، ذراتی هستند که بافر به آنها اضافه نمی‌شود و در دمای محیط تهیه می‌شوند. ولی، به نانومیسسل‌های کازئینی پس از حل کردن در آب 4°C ، طی ۸ مرحله بافر اضافه می‌شود. با اندازه‌گیری پایداری امگا سه، مشخص شده طی ۳۷ روز مقدار ۶۸٪ امگا سه بارگذاری شده به کازئین، تغییر نکرده بود. در حالی که امگا سه محلول در آب، از ۱۰۰٪ به کمتر از ۱۰٪ کاهش یافت. همچنین، در نانومیسسل کازئینی مقدار ۶۲/۳٪ اولیه بارگذاری شده، تقریباً در مدت ۱۵ روز تغییری نکرده بود، ولی امگا سه محلول در آب در همین شرایط، ۹۳٪ تجزیه شده بود. در مطالعه دیگری Semo و همکاران [۸] از سدیم کازئینات به عنوان حامل ویتامین D استفاده کردند و سپس آنها را در معرض پرتو فرابنفش قرار دادند. نتایج حاصل نشان داد، ویتامین D موجود در سرم به شدت کاهش می‌یابد. اما، ویتامین D موجود در میسل، در برابر نور محافظت می‌شود.

Liang و همکاران [۲۵] درباره کمپلکس β -لاکتوگلوبولین- α -توکوفرول و اثر آن بر α -توکوفرول، نیز نتایج مشابهی گزارش کردند. α -توکوفرول وقتی در معرض نور، اکسیژن یا هوا قرار می‌گیرد، تخریب می‌شود. آنها پایداری α -توکوفرول را در مجاورت β -لاکتوگلوبولین و بدون آن ارزیابی کردند. کاهش شدید اولیه α -توکوفرول در نمونه‌های بدون توکوفرول مشاهده شد، به طوری که پس از ۲ روز، ۴۸٪ باقی ماند و پس از ۷ روز به طور کامل تخریب شد، اما در مجاورت $2 \mu\text{mol}$ β -لاکتوگلوبولین، ۵۵٪ از α -توکوفرول پس از ۷ روز، سالم باقی ماند و در مجاورت $10 \mu\text{mol}$ از β -لاکتوگلوبولین، پس از ۷ روز، ۴۴٪ آن بدون تغییر باقی ماند.

۰/۳٪، ۳۵٪ از ویتامین نابود شده است.

در شکل ۹، سطح زیر منحنی نمونه‌های استاندارد، سدیم کازئینات آمده است. نتایج حاکی از آن است که اگرچه سدیم کازئینات می‌تواند ویتامین D را در برابر تخریب حفظ کند، ولی افزودن کاراگینان باعث حفاظت بسیار بیشتر این ویتامین در برابر عوامل محیطی می‌شود. مهم‌ترین سازوکار حفاظت، جلوگیری از تخریب ناشی از واکنش با اکسیژن و رادیکال‌های تولید شده در فرایند اکسایش با پرتوهای فرابنفش است. این حفاظت احتمالاً به دلیل خاصیت ضداکسندگی گروه‌های تیول پروتئین است. همین‌طور پروتئین باعث به تلافی دادن ویتامین و در نتیجه کاهش فعالیت آن شده و واکنش‌های شیمیایی با عوامل اکسنده مثل اکسیژن و رادیکال‌های آزاد را کم می‌کند. افزودن کاراگینان باعث ایجاد لایه‌های بیشتر در اطراف ویتامین و حفاظت بیشتر می‌شود. چون نفوذ نور، اکسیژن، رادیکال‌های آزاد و خروج ویتامین کمتر می‌شود. این نتایج با پژوهش‌های Ron و همکاران [۱۴] مطابقت دارد. در این پژوهش نیز β -لاکتوگلوبولین - پکتین از برهم‌کنش الکتروستاتیک، به عنوان حامل ویتامین D استفاده و طی آن ویتامین D در برابر تابش محافظت شد.

طی این مطالعه، پس از یک هفته ویتامین D محافظت نشده کاملاً تخریب شد. اما، ویتامین D به تلافی افتاده به وسیله β -لاکتوگلوبولین، به مقدار ۲۰٪ حفظ شده بود. آنها معتقد بودند، این کمپلکس در واقع یک نانوزل است و احتمالاً نفوذ عوامل اکسنده در ژل کندتر از محلول خالص است. نتایج آنها نشان می‌دهد، کمپلکس β -لاکتوگلوبولین - پکتین به ویتامین D2 متصل شده و اثر محافظت‌کنندگی خوبی دارد و به کاهش تخریب ویتامین D کمک می‌کند.

Zimet و همکاران [۲۶] در پژوهشی نانوذرات کازئینی و میسل

نتیجه‌گیری

ذرات پروتئین و افزایش تعداد ذرات باشد. بازده کپسولی شدن به وسیله کازئینات و کمپلکس کازئینات - کاراگینان حدود ۵۰٪ بوده که نزدیک به اعداد گزارش شده برای سایر مواد آبرگیز است. همچنین، استفاده از کاراگینان به عنوان پوششی برای کازئینات حامل، مقدار کاهش ویتامین D را ۱۰-۱۵٪ کاهش داد که نشان‌دهنده مفید بودن استفاده از کاراگینان برای حفاظت بیشتر محموله، افزون بر کاهش اندازه ذرات است.

سدیم کازئینات و کاراگینان می‌توانند در pH مناسب (۴/۹) و نسبت مناسب پروتئین به پلی‌ساکارید، ذرات نانومتر تشکیل دهند. بیشتر بودن مقادیر کازئینات به کاراگینان می‌تواند موجب افزایش اندازه ذرات شود. بنابراین، تعیین این نسبت بسیار مهم است. کپسولی شدن ویتامین D نیز می‌تواند قطر این ذرات را افزایش دهد. افزایش کدورت در اثر افزودن کاراگینان، می‌تواند ناشی از ممانعت از به هم پیوستن

مراجع

- Nedovica V., Kalusevica A., Manojlovich V., Levica S., and Bugarskib B., An Overview of Encapsulation Technologies for Food, *Procedia. Food. Sci.*, **1**, 1806-1815, 2011.
- Zuidam J.N. and Shimoni E., *Overview of Microencapsulates for Use in Food Products or Processes and Methods to Make Them*, 1-10, 2010.
- Chaudhry Q., Watkins R., and Castle L., *Nanotechnologies in the Food Area: New Opportunities, New Questions, New Concerns*, RSC, 1-16, 2010.
- Chen L., Remondetto G.E., and Subirade M., Food Protein-based Materials as Nutraceutical Delivery Systems, *Trend. Food. Sci. Technol.*, **17**, 272-283, 2006.
- Fang Z. and Bhesh B., Encapsulation of Polyphenols, *Trend. Food. Sci. Technol.*, **21**, 510-523, 2010.
- Blitz H.D., Grosch W., and Schieberle P., *Food Chemistry*, Springer Verlag, Germany, 4th ed., 311-350, 2009.
- Lovett M., *Calcium Chloride and Vitamin D Fortified Beverags*, MSc Thesis, North Carolina State University, 2007.
- Semo E., Kesselman E., Danino D., and Livney Y.D., Casein Micelle as a Natural Nanocaps Ular Vehicle for Nutraceuticals, *Food. Hydrocolloid.*, **21**, 936-942, 2007.
- Livney Y.D., Milk Proteins as Vehicles for Bioactives, *Colloid. Interface. Sci.*, **15**, 73-83, 2010.
- Turgeon S.L. and Laneuville S.I., *Modern Biopolymer Science*, Elsevier, USA, Chapt. 11, 339-342, 2006.
- Ye A., Complexation between Milk Proteins and Polysaccharides via Electrostatic Interaction: Principles and Applications, *Int. J. Food. Sci. Technol.*, **43**, 406-415, 2008.
- Matalanis A., Jones O., and McClements D.J., Structure Biopolymer-based Delivery Systems for Encapsulation, Protection, and Release of Lipophilic Compounds, *Food. Hydrocolloid.*, **3**, 1-16, 2011.
- Zimet P. and Livney Y.D., Beta-lactoglobulin and Its Nanocomplexes with Pectin as Vehicles for Omega-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.
- 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.
- Sarblooki M., *Practical of Organic Chemistry*, Jihad, Tehran, 130-170, 1995.
- Iñón A.F., Garrigues S., and Guardia M., Nutritional Parameters of Commercially Available Milk Samples by FTIR and Chemometric Techniques, *Analytica Chimica Acta*, **513**, 401-412, 2004.
- Qingzhi D. and You-Lo H., Acrylonitrile Graft Copolymerization of Casein Proteins for Enhanced Solubility and Thermal Properties. *J. Appl. Polym. Sci.*, **77**, 2543-2551, 2000.
- Pielichowski K. and Njuguna J., *Thermal Degradation of Polymeric Material*, Rapra Technology limit, UK, 2005.
- Vincekovic M., Pustak A., Tusek-Bozic L., Liu F., Ungar G., Bujan M., Smit I., and Filipovic-Vincekovic N., Structural and Thermal Study of Mesomorphic Dodecylammonium Carrageenates, *J. Colloid. Interface Sci.*, **341**, 117-123, 2010.
- Sankalia M., Mashru R.C., Sankalia J.M., and Sutariya V.M.,

- Stability Improvement of Alpha-Amylase Entrapped in Kappa-Carrageenan Beads: Physicochemical Characterization and Optimization Using Composite Index, *Int. J. Pharmaceutics*, **312**, 1-12, 2006.
22. Dudhani A.R. and Kosaraju S.L., Bioadhesive Chitosan Nanoparticles: Preparation and Characterization, *Carbohydr. Polym.*, **81**, 243-251, 2010.
23. Relkin P. and Shukat R., Food Protein Aggregates as Vitamin-Matrix Carriers: Impact of Processing Conditions, *Food Chem.*, **134**, 2141-2148, 2012.
24. 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. Surface. B.*, **85**, 145-152, 2011.
25. Liang Li., Hébert T.V., and Subirade M., Characterisation of the β -Lactoglobulin/ α -Tocopherol Complex and Its Impact on α -Tocopherol Stability, *Food Chem.*, **126**, 821-826, 2011.
26. Zimet P., Rosenberg D., and Livney Y.D., Re-assembled Casein Micelles and Casein Nanoparticles as Nano-Vehicle for Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids, *Food Hydrocolloid.*, **25**, 1270-1276, 2011.