

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد صنایع غذایی

بررسی اثر دما، زمان و غلظت روی درون پوشانی آهن در نانوذلهای تهیه شده از ایزوله پروتئین سویا به روش ژله‌ای شدن سرد

نگارنده: سیما سامانیان

اساتید راهنما:

دکتر احمد رجائی

دکتر سید محمد هاشم حسینی

بهمن ۱۳۹۵

دانشگاه شاهرود

دانشکده کشاورزی

گروه : صنایع غذایی

پایان نامه کارشناسی ارشد آقای / خانم سیما سامانیان به شماره دانشجویی: ۹۳۰۹۱۸۴

تحت عنوان: بررسی اثر دما، زمان و غلظت روی درون پوشانی آهن در نانوزل‌های تهیه شده از ایزوله پروتئین سویا به روش ژله‌ای شدن سرد.

در تاریخ ۹۵/۱۱/۱۷ توسط کمیته تخصصی زیر جهت اخذ مدرک کارشناسی ارشد رشته مهندسی کشاورزی - صنایع غذایی مورد ارزیابی و با درجه بسیار خوب مورد پذیرش قرار گرفت.

امضاء	اساتید مشاور	امضاء	اساتید راهنما
	نام و نام خانوادگی :		نام و نام خانوادگی : احمد رجایی
	نام و نام خانوادگی :		نام و نام خانوادگی : سید محمدهاشم حسینی

امضاء	نماینده تحصیلات تکمیلی	امضاء	اساتید داور
	نام و نام خانوادگی : حسن قربانی قوزدی		نام و نام خانوادگی : حمیدرضا صمدلونی
			نام و نام خانوادگی : کامبیز جهان‌بین

تقدیم به مادرم که مهرش، شکیبایی و مثبت اندیشی اش همواره در مسیر زندگی سرشق من است

تقدیم به پدرم که در کوران های سخت روزگار ناگاه امن من است

تقدیم به همسرم که ناسادی و امیدواری در دفتر عمرم و سایه مهربانیش سایه ساز زندگی من است

پروردگار ابرای عزیزترین عزیزانم عاقبت بخیری، سلامتی، سربلندی و دل خوشی از درگاهت تمنا دارم

سایش و سپاس بیکران بایسته آن الهه یکتا به خاطر همه مهربانیش و تمام بهرایی بایش

و غنیمت شاکردی خودمی دانم تا مراتب سپاس و قدردانی ویژه خویش را با صمیمیت هر چه تمام تر به محضر اساتید راهنمای گران بایه و بزرگوارم جناب

آقای دکتر رجایی و جناب آقای دکتر حسینی که در تمام مراحل رهنمودهای ارزنده شان را هکشتای این جانب بود، تقدیم نمایم. اگر چه اشتیاقی که

برای قدردانی دارم، هرگز با شور و یجایی که ایشان در انجام امور تحقیقاتی به خرج دادند برابری نخواهد کرد.

فرصت را معنتم شمرده و از کلیه اساتید محترم گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه صنعتی شاهرود و دانشگاه شیراز به خاطر لطف و بهکاری شان صمیمانه

تشکرمی نمایم.

پاسکزارم

نه برای آنچه هستم که بودم هیچ نیست، برای آنچه آموختید به من که باشم

برای درس ارزشمند تلاش که در محضر شما آموختم

و در آخر از خانواده عزیز و همسر مهربانم که وجودشان تاج افتخاری است بر سرم و صفایشان بایه آرامش من است پاسکزارم.

تعهد نامه

اینجانب سیما سامانیان دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه بررسی اثر دما، زمان و غلظت روی درون پوشانی آهن در نانوذلهای تهیه شده از ایزوله پروتئین سویا به روش ژله‌ای شدن سرد تحت راهنمایی دکتر احمد رجایی - دکتر سید محمدهاشم حسینی متعهد می شوم.

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است.
- در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است.
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است.
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه صنعتی شاهرود » و یا «Shahrood University of Technology» به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که از موجود زنده (یا بافتهای آنها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است.

تاریخ

امضای دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، کتاب، برنامه های رایانه ای، نرم افزارها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد. این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود.
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.

چکیده

آهن یکی از ریزمغذی‌های ضروری در تغذیه انسان است که کمبود آن یکی از شایع‌ترین کمبودهای تغذیه‌ای در جهان می‌باشد و عوارضی از قبیل کم‌خونی، عقب‌ماندگی ذهنی، کاهش رشد فیزیکی و افزایش خطر مرگ‌ومیر به هنگام زایمان را به دنبال دارد. درون‌پوشانی آهن می‌تواند روشی مؤثر در بهبود کارایی بیولوژیکی آن مانند ماندگاری، تحویل کنترل‌شده (در مقدار و مکان معین) و جلوگیری از ایجاد اثرات جانبی باشد. هدف از این کار پژوهشی تولید نانوژل ایزوله پروتئین سویا به روش ژله‌ای شدن سرد و بررسی ویژگی‌ها و کارایی آن در انتقال و رهایش آهن بود. جهت یافتن شرایط بهینه تولید ژل به روش ژله‌ای شدن سرد، محلول ایزوله پروتئین سویا در دما (۸۰-۱۲۰ درجه سانتی‌گراد) و زمان‌های مختلف (۲۰-۱۸۰ دقیقه) حرارت داده شد و از غلظت‌های مختلف کلرید کلسیم (۵-۵۰ میلی‌مولار) جهت تشکیل ژل استفاده شد که بهترین شرایط از لحاظ دما و غلظت کلرید کلسیم به ترتیب ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد و ۲۰ میلی‌مولار بود و طبق نتایج به‌دست‌آمده زمان حرارت دهی تأثیر قابل‌توجهی بر خصوصیات ژل نداشت. در ادامه اندازه ذرات نانوژل‌ها توسط پراش استاتیک پرتو لیزر بررسی شد. نتایج نشان داد که استفاده از امواج فراصوت با توان ۹۰ وات، فرکانس ۲۰ کیلوهرتز و دامنه ۷۵٪ منجر به تولید نانوژل‌هایی در محدوده ۱۰۷ نانومتر شد. در مورد ویژگی ظاهری ژل‌ها نتایج نشان داد که با افزایش غلظت آهن در ساختار ژل، شاخص سفیدی افزایش و این شاخص و شاخص قرمزی در نانوژل‌ها به دلیل کاهش اندازه ذرات کاهش یافت. نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که نانوژل ایزوله پروتئین سویا به‌خوبی می‌تواند عمل درون‌پوشانی را افزایش دهد. افزایش غلظت آهن موجب افزایش کارایی درون‌پوشانی ۷۸٪ به ۹۴٪ شد. آزمایش‌های مربوط به چگونگی رهایش آهن در شرایط شبیه‌سازی‌شده روده و معده انجام شد و طبق نتایج، رهایش آهن در شرایط معده ۱۹٪ درصد از آهن کپسوله شده و در شرایط روده ۸۹٪ درصد بود.

بافت ژل‌ها توسط دستگاه بافت سنج ارزیابی شد و آزمون آنالیز پروفایل بافت (TPA) نشان داد که با افزایش غلظت آهن پیوستگی، افزایش یافت اما سفتی، فنریت، مقاومت به جویدن، صمغیت و چسبندگی ژل کاهش یافت.

کلمات کلیدی: ایزوله پروتئین سویا، درون پوشانی، ژله‌ای شدن سرد، نانوذله، رهایش آهن، فراصوت

فهرست

صفحه	عنوان
۱	فصل اول: کلیات
۲	۱-۱- غنی سازی مواد غذایی با آهن
۳	۱-۲- درون پوشانی ترکیبات و مزایای آن
۴	۱-۳- انواع روش های درون پوشانی
۵	۱-۳-۱- خشک کردن پاششی
۶	۱-۳-۲- سرد کردن پاششی
۶	۱-۳-۳- پوشش دهی بسترسیال
۷	۱-۳-۴- روش گنجایش مولکولی
۷	۱-۳-۵- روش تبلور (کریستالیزاسیون)
۷	۱-۳-۶- روش توده ای
۸	۱-۳-۷- تکنیک بارش نانو
۸	۱-۴- فناوری نانو در صنایع غذایی
۹	۱-۵- روش های ساخت نانوذرات
۱۱	۱-۵-۱- روش سل-ژل

- ۱-۵-۲- تکنیک‌های هیدروترمال ۱۱
- ۱-۵-۳- رسوب‌دهی لیزر پالسی ۱۲
- ۱-۵-۴- رسوب‌گیری شیمیایی ۱۳
- ۱-۵-۵- روش سونوشیمیایی یا اولتراسوند ۱۳
- ۱-۶- سیستم‌های نانو حامل ۱۵
- ۱-۷- انواع نانو حامل‌ها ۱۹
- ۱-۷-۱- نانو کپسول‌های لیپیدی ۱۹
- ۱-۷-۱-۱- لیپوزوم ۱۹
- ۱-۷-۱-۲- نانو امولسیون ۲۰
- ۱-۷-۱-۳- نانو ساختارهای لیپیدی جامد ۲۱
- ۱-۷-۱-۴- میکرو امولسیون ۲۱
- ۱-۷-۲- نانو کپسول‌های پلیمری ۲۲
- ۱-۷-۲-۱- نانولوله‌ها ۲۲
- ۱-۷-۲-۲- نانو حامل‌های پلی‌ساکاریدی ۲۲
- ۱-۷-۲-۳- نانو حامل‌های پروتئینی ۲۳
- ۱-۸- نانو حامل‌های بر پایه ایزوله پروتئین سویا ۲۳

- ۹-۱- تشکیل ژل پروتئینی ۲۴
- ۱۰-۱- نانوذله‌های پروتئینی ۲۶
- ۱۱-۱- ژله‌ای شدن به روش سرد ۲۷
- فصل دوم: مروری بر پژوهش‌های پیشین ۲۹
- ۱-۲- تأثیر دما بر تشکیل ژل به روش ژله‌ای شدن و درون پوشانی ۳۰
- ۲-۲- تأثیر غلظت نمک، پروتئین و آهن بر تشکیل ژل به روش ژله‌ای شدن سرد و درون پوشانی ... ۳۱
- ۳-۲- تأثیر pH بر تشکیل ژل به روش ژله‌ای شدن سرد و درون پوشانی ۳۵
- ۴-۲- استفاده از اولتراسوند در تولید ژل به روش ژله‌ای شدن سرد ۳۷
- فصل سوم: مواد و روش‌ها ۴۱
- ۱-۳- مواد مورد استفاده جهت تهیه نانو ژل ایزوله پروتئین سویا ۴۲
- ۲-۳- تجهیزات و لوازم آزمایشگاهی ۴۳
- ۳-۳- روش‌های مورد استفاده ۴۴
- ۱-۳-۳- تهیه نانو ژل ایزوله پروتئین سویا حاوی سولفات آهن ۴۴
- ۲-۳-۳- بازدهی درون پوشانی ۴۵
- ۳-۳-۳- بررسی رهایش آهن درون پوشانی شده در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش ۴۷
- ۴-۳-۳- اندازه‌گیری خواص رنگی ۴۸

۴۸ اندازه‌گیری اندازه ذرات تولیدشده
۵۰ آنالیز پروفیل بافت ژل
۵۲ آنالیز آماری
۵۳ فصل چهارم: بحث و نتایج
۵۴ ۱-۴-شرایط بهینه تشکیل ژل
۵۴ ۱-۱-۴-شرایط بهینه دمای حرارت دهی جهت تشکیل ژل
۵۵ ۲-۱-۴-شرایط بهینه زمان حرارت دهی جهت تشکیل ژل
۵۶ ۳-۱-۴-غلظت بهینه کلرید کلسیم جهت تشکیل ژل
۵۷ ۲-۴-اندازه ذرات
۵۸ ۳-۴-ارزیابی رنگ ژل ایزوله پروتئین سویا و نانوذله‌های آن
۶۱ ۴-۴-کارایی انکپسولاسیون
۶۲ ۵-۴-سنتیک رهایش آهن در طول هضم غذا در شرایط برون بدن
۶۴ ۶-۴-آنالیز پروفیل بافت ژل
۶۴ ۱-۶-۴-سفتی بافت
۶۵ ۲-۶-۴-پیوستگی بافت
۶۵ ۳-۶-۴-ارتجاع پذیری بافت
۶۶ ۴-۶-۴-صمغی بودن
۶۷ ۵-۶-۴-مقاومت به جویدن
۶۸ ۶-۶-۴-چسبندگی
۷۰ ۱۲-۴-نتیجه‌گیری
۷۱ ۱۳-۴-پیشنهادات
۷۲ منابع

فهرست اشکال

عنوان	صفحه
شکل ۱-۱: انواع سیستم‌های حامل بر پایه لیپیدی	۱۶
شکل (۱-۳): دستگاه اولتراسوند مدل 7 LS BANDELIN آلمان	۴۵
شکل (۲-۳): دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل UNICO UV-2100، آمریکا	۴۶
شکل (۳-۳): منحنی استاندارد آهن	۴۷
شکل (۴-۳): دستگاه اندازه‌گیری اندازه ذرات مدل Sald 2101	۵۰
شکل (۵-۳): دستگاه بافت سنج TA-TX2، شرکت Stable Micro Systems انگلستان	۵۲
شکل (۱-۴): نتایج حاصل از آزمون اندازه ذرات با استفاده از SLS	۵۸
شکل (۲-۴): تأثیر مقادیر مختلف آهن بر شاخص سفیدی ژل ایزوله پروتئین سویا و نانوزل آن	۵۹
شکل (۳-۴): تأثیر استفاده از امواج فراصوت بر شاخص قرمزی	۶۰
شکل (۴-۴): تأثیر مقادیر مختلف آهن بر شاخص زردی ژل ایزوله پروتئین سویا و نانوزل آن	۶۰
شکل (۵-۴): رهایش آهن از نانوزل ایزوله پروتئین سویا در شرایط شبیه‌سازی دستگاه گوارش	۶۳
شکل (۶-۴): سفتی بافت در ژل ایزوله پروتئین سویا	۶۴
شکل (۷-۴): میزان پیوستگی ژل ایزوله پروتئین سویا	۶۵
شکل (۸-۴): میزان فنریت ژل ایزوله پروتئین سویا	۶۶
شکل (۹-۴): میزان صمغیت ژل ایزوله پروتئین سویا	۶۷
شکل (۱۰-۴): مقاومت به جویدن در ژل ایزوله پروتئین سویا	۶۸
شکل (۱۱-۴): چسبندگی ژل ایزوله پروتئین سویا	۶۹

فهرست جداول

صفحه	عنوان
۵۱	جدول (۱-۳): برنامه داده شده به دستگاه بافت سنج به منظور بررسی قدرت ژل
۵۸	جدول (۱-۴): اندازه ذرات نانوژل
۶۲.....	جدول (۲-۴): کارایی درون پوشانی در غلظت‌های مختلف آهن در ۳ بار تکرار

آهن یکی از ریزمغذی‌های ضروری در تغذیه انسان و هم‌چنین اساسی‌ترین جز هم در هموگلوبین و میوگلوبین می‌باشد که نقش مهمی در انتقال، ذخیره‌سازی و استفاده از اکسیژن دارد. این عنصر به‌طور طبیعی در ساختار سیتوکروم‌ها، آنزیم‌ها، هموگلوبین و میوگلوبین وجود دارد. هم‌چنین به‌عنوان کوفاکتور در فرآیندهای بیوشیمیایی گوناگون مانند سنتز DNA مشارکت دارد. فقر آهن به‌طور معمول نتیجه کمبود آهن در رژیم غذایی، عدم جذب آهن موجود در رژیم غذایی و یا ترکیبی از این دو مورد می‌باشد که کمبود آن عوارضی نظیر کم‌خونی، عقب‌ماندگی ذهنی، کاهش رشد فیزیکی، کند شدن تکامل مغزی و کاهش مصونیت در برابر امراض را در پی دارد [۱]. هم‌چنین سبب کاهش کارایی بزرگسالان، اختلال در علائم شناختی کودکان، تضعیف بارداری [۲] و افزایش خطر مرگ‌ومیر به‌هنگام زایمان و ایجاد بیماری در مادر و جنین می‌گردد [۳]. از آن‌جاکه وجود آهن برای تشکیل خون اهمیت دارد، فقر آهن اغلب منجر به کم‌خونی می‌گردد که سطح هموگلوبین خون به پایین‌تر از سطح استاندارد کاهش می‌یابد. کمبود آهن یکی از شایع‌ترین کمبودهای تغذیه‌ای در جهان است که غنی‌سازی مواد غذایی بهترین و مؤثرترین روش جهت افزایش مصرف آهن بدون تغییر در الگوی رژیم غذایی موجود می‌باشد [۴]. اگرچه غنی‌سازی ممکن است هزینه ماده غذایی غنی شده را افزایش دهد، اما نسبت به سایر روش‌های مقابله با کمبود ریزمغذی‌ها مقرون به‌صرفه‌ترین راه‌کار می‌باشد [۵]. غنی‌سازی با آهن از لحاظ تکنیکی مشکل‌تر از غنی‌سازی مواد غذایی با سایر ریزمغذی‌ها است، زیرا مشکلات متعددی از جمله قابلیت دسترسی زیستی^۱ پائین، اثر نامطلوب روی طعم و رنگ محصول و ناپایداری و تخریب در طی فرآوری یا انبارداری به دلیل حساسیت به رطوبت، نور، دما و pH دارد [۶]. از طرف دیگر غنی‌سازی مستقیم مواد غذایی با مواد معدنی و ویتامین‌ها راه‌کار مناسبی نمی‌باشد و برخی از ریزمغذی‌ها ممکن است باعث ایجاد مشکلاتی در کیفیت حسی محصولات از جمله تغییر رنگ، طعم نامطلوب و بافت

¹ Bioavailability

شنی گردند. برخی دیگر از ریزمغذی‌ها سبب تسریع واکنش‌های شیمیایی شده و نهایتاً منجر به کاهش کیفیت تغذیه‌ای مواد غذایی و ایجاد سموم می‌شوند. علاوه بر این برخی از ریزمغذی‌ها به دمای بالا، تغییرات pH، اکسیژن و رطوبت حساس بوده که این عوامل می‌تواند منجر به تخریب آن‌ها در طی آماده‌سازی، فرآوری و انبارداری گردد [۷]. در سال‌های اخیر، کاربرد نانوذرات^۱ جهت محافظت و انتقال ترکیبات ضروری و مغذی مورد توجه قرار گرفته است. با تولید نانوذرات خوراکی، هم‌چنین با پوشش دهی ترکیبات حساس و مواد ناپایدار می‌توان از آن‌ها محافظت کرده و تا رسیدن ترکیب به مناطق هدف، به صورت غیرفعال در بدن باقی بمانند [۸]. یک استراتژی مهم جهت حل مشکلات غنی سازی تکنولوژی درون پوشانی^۲ می‌باشد که در این تکنیک مواد حساس مثل ویتامین‌ها و مواد معدنی در حامل‌ها یا مواد پوشش‌دهنده قبل از افزودن به مواد غذایی محصور می‌گردند [۷]. با توجه به این که حضور اسیدهای آمینه در روده جهت افزایش دسترسی به آهن مورد نیاز است [۹]، استفاده از ژل‌های پروتئینی و به دام انداختن مولکول‌ها درون شبکه پروتئینی راه کار مناسبی جهت محافظت از آهن در برابر اکسیداسیون، افزایش جذب آن در رژیم غذایی، پوشش طعم نامطلوب و بهبود خواص بافتی در محصول می‌باشد [۱۰].

از آنجا که کم‌خونی فقر آهن یکی از شایع‌ترین کمبودهای تغذیه‌ای در جهان است و یکی از راه‌های مقابله با آن تقویت مواد غذایی با آهن و بهبود جذب آهن می‌باشد، هدف از این تحقیق، درون پوشانی آهن در نانوزل‌های^۳ تهیه شده از ایزوله پروتئین سویا^۴ به روش ژله‌ای شدن سرد^۵ و بررسی و یافتن بهترین دما، زمان و غلظت آهن و کلرید کلسیم در تهیه نانوزل‌های تولید شده و بازده آن در محافظت از آهن می‌باشد.

¹ Nano particles

² Encapsulation

³ Nano gels

⁴ Soy protein isolate

⁵ Cold set gel

فصل اول: کلیات

۱-۱- غنی سازی مواد غذایی با آهن

اساساً آهن یکی از ریزمغذی‌های حیاتی در تغذیه انسان است که وظایف مهمی از جمله انتقال اکسیژن در گلبول‌های قرمز، تولید هموگلوبین خون، عملکرد صحیح آنزیم‌ها و تقویت سیستم ایمنی را به عهده دارد. کمبود آهن عوارضی مانند کاهش ضریب هوشی، کم شدن کارایی، کاهش مصونیت در برابر بیماری‌ها، خستگی زودرس، ضعف جسمانی و مهم‌تر از همه کم‌خونی را به دنبال دارد. کم‌خونی فقر آهن شایع‌ترین نوع کم‌خونی در جهان بوده و عمده‌ترین علت آن کمبود آهن می‌باشد [۱]. تاکنون برای برطرف کردن فقر آهن سه راه‌کار شامل اصلاح و تنوع رژیم غذایی، استفاده از مکمل و تقویت کردن^۱ مواد غذایی (افزودن ریزمغذی‌ها به غذاهای فرآیند شده) پیشنهاد شده است. اصولاً تقویت کردن به دلیل هزینه کم و آسان بودن بهترین و عملی‌ترین روش درازمدت برای جبران کمبود آهن می‌باشد. تقویت کردن به عملیات افزودن مواد مغذی به منابع غذایی به‌منظور سرشار کردن آن ماده غذایی از ماده مغذی موردنظر اطلاق می‌گردد که در واقع هدف افزایش مقدار ماده مغذی است ولی اصطلاح غنی سازی اغلب برای جبران مقدار ازدست‌رفته یک ماده مغذی در حین فرآیند در یک ماده غذایی می‌باشد. غنی سازی مستقیم مواد غذایی با مواد معدنی و ویتامین‌ها راه‌کار مناسبی نمی‌باشد و برخی از ریزمغذی‌ها ممکن است باعث ایجاد مشکلاتی در کیفیت حسی محصولات از جمله تغییر رنگ، طعم نامطلوب و بافت شنی گردند. برخی دیگر از ریزمغذی‌ها سبب تسریع واکنش‌های شیمیایی شده و نهایتاً منجر به کاهش کیفیت تغذیه‌ای مواد غذایی و ایجاد سموم می‌شوند. علاوه بر این برخی از ریزمغذی‌ها به دمای بالا، تغییرات pH، اکسیژن و رطوبت حساس بوده که این عوامل می‌تواند منجر به تخریب آن‌ها در طی آماده‌سازی، فرآوری و انبارداری گردد [۷].

یک استراتژی مهم جهت حل مشکلات غنی سازی تکنولوژی درون پوشانی می‌باشد.

¹ Fortification

۱-۲- درون پوشانی ترکیبات و مزایای آن

با افزایش روزافزون تقاضا برای مصرف غذاهای دارای ویژگی‌های تغذیه‌ای خاص مانند غذاهای غنی شده با مواد زیست فعال مختلف، تولیدکنندگان مواد غذایی سعی می‌کنند فرمول‌بندی‌های خود را تغییر دهند. با این حال، افزودن ترکیبات زیست فعال به مواد غذایی مختلف به آسانی قابل انجام نیست و معمولاً این ترکیب‌ها در بافت و طعم مواد غذایی اثر می‌گذارند. به علاوه این ترکیبات در برابر فرآیندهای اعمال شده روی ماده غذایی در دماهای بالا، زمان نگهداری در دماهای پایین، در تداخل با سایر ترکیب‌های موجود در غذا و یا طی عبور از دستگاه گوارش به دلیل تغییرات شدید pH، پایداری نداشته و غیرفعال یا تجزیه می‌شوند؛ بنابراین درون پوشانی می‌تواند شیوه مناسبی برای محافظت آن‌ها و بهبود ویژگی‌های حسی غذاهای سلامت افزا^۱ باشد [۱۱]. در واقع درون پوشانی فناوری بسته‌بندی مواد جامد، مایع یا گاز در ابعاد بسیار ریز در کپسول‌های دربندی شده می‌باشد که قادر است محتویات خود را با سرعت کنترل شده و تحت شرایط خاص آزاد کند. مواد بسته‌بندی شده می‌تواند به صورت خالص یا مخلوط باشند که به نام‌های مختلفی اعم از مواد پوشش داده شده، مواد هسته، پرکننده، فعال یا فاز داخلی نامیده می‌شوند. از سوی دیگر به مواد محصورکننده، پوشش‌دهنده، دیواره، کپسول، حامل یا پوسته گفته می‌شود که می‌تواند از جنس ترکیبات قندی، صمغ‌ها، پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدهای طبیعی و اصلاح شده، لیپیدها و پلیمرهای سنتزی باشند. این کپسول‌های کوچک ذراتی با اندازه کوچک‌تر از میکرون تا چند میلی‌متر بسته به نوع فناوری ریز پوشانی می‌باشند [۱۲]. ترکیبات غذایی اسیدی، طعم‌دهنده‌ها، شیرین‌کننده‌ها، رنگ‌دهنده‌ها، لیپیدها، ویتامین‌ها و مواد معدنی، آنزیم‌ها و میکروارگانیسم‌ها را به عنوان مواد هسته با استفاده از فناوری‌های مختلف می‌توان درون پوشانی نمود [۱۳]. مواد دیواره نیز شامل محدوده وسیعی از ترکیبات شامل کربوهیدرات‌ها (مالتودکسترین‌ها و مواد جامد شربت ذرت، نشاسته اصلاح شده، سیکلودکسترین‌های طبیعی و اصلاح شده،

¹ Functional Foods

ساکارز، کیتین و کیتوزان، سلولز)، صمغ‌ها (عصاره‌های جلبک دریایی، صمغ‌های ترش‌حی)، لیپیدها (موم‌ها، استوآسیل گلیسرول‌ها، لستین‌ها، لیپوزوم‌ها) و پروتئین‌ها می‌باشند [۱۲].

یک سامانه انتقال‌دهنده باید نقش‌های متفاوتی را داشته باشد. اول این‌که باید به‌عنوان یک وسیله حمل برای ترکیبات سلامت‌افزا به محل موردنظر باشد. دوم این‌که ترکیبات زیست‌فعال را از تخریب‌های شیمیایی و زیستی (مانند اکسیداسیون) طی فرآوری، نگهداری و تولید محافظت نماید تا ترکیب زیست‌فعال در حالت فعال خود باقی بماند. سوم این‌که ممکن است لازم باشد تا رهایش ترکیب زیست‌فعال را کنترل نماید، مانند میزان رهایش یا شرایط محیطی خاصی که رهایش هدفمند را کنترل می‌نماید (مانند pH، قدرت یونی یا دما). چهارم این‌که سامانه انتقال‌بایستی با سایر ترکیبات موجود در ماده غذایی و نیز با ویژگی‌های کیفی و فیزیکوشیمیایی محصول نهایی (ظاهر، بافت، طعم و زمان ماندگاری) سازگاری داشته باشد. سامانه‌های انتقال‌زیادی برای درون‌پوشانی ترکیبات زیست‌فعال توسعه‌یافته‌اند، مانند محلول‌های ساده، کلوئیدهای حاوی ذرات میسلی، امولسیون‌ها و ماتریس‌های حاصل از پلیمرهای زیستی [۱۴].

۱-۳- انواع روش‌های درون‌پوشانی

درون‌پوشانی به روش‌های مختلفی بسته به نوع مواد هسته، دیواره و کاربرد آن انجام می‌شود. روش‌های درون‌پوشانی عبارت‌اند از: خشک کردن پاششی^۱، سرد کردن پاششی^۲، پوشش دهی بسترسبیال^۳، اکستروژن^۴، اکستروژن سانتریفوژی^۵، خشک کردن انجمادی^۶، روش توده‌ای (تراکمی)^۷، جداسازی

¹ Spray Drying

² Spray Chilling

³ Fluidized bed coating

⁴ Extrusion

⁵ Centrifugal extrusion

⁶ Lyophilization

⁷ Coacervation

سوسپانسیون سانتریفوژی^۱، کو- کریستالیزاسیون^۲، محصورسازی لیپوزومی^۳، پلیمریزاسیون بین سطحی^۴، گنجایش مولکولی^۵، سیستم رهایش نانوذرات^۶. با توجه به نوع روش انتخابی برای درون پوشانی، اشکال متفاوتی از کپسول‌ها به دست می‌آید [۱۵].

در زیر به‌طور مختصر به برخی از روش‌های پرکاربرد درون پوشانی اشاره شده است:

۱-۳-۱- خشک کردن پاششی:

این روش پر استفاده‌ترین تکنیک میکروانکپسولاسیون در صنایع غذایی است و به‌طور معمول برای آماده‌سازی افزودنی‌ها و طعم‌های غذایی خشک و پایدار و اجزا عملگر به کار می‌رود. نانو و میکروذرات ساخته شده به این روش، به خاطر کاربرد گسترده‌شان به‌عنوان یک فرآیند ساخت جالب‌توجه در صنعت دارویی معرفی گردیده‌اند. خشک کردن پاششی از لحاظ اقتصادی مقرون‌به‌صرفه و ارزان است و ذراتی با کیفیت خوب تولید می‌کند و هم‌چنین منطبق با تجهیزات فراوری رایج مورد استفاده است و ذراتی با کیفیت مناسب تولید می‌کند. در درون پوشانی به روش خشک کردن پاششی، ابتدا امولسیون از مواد هسته و دیواره تهیه می‌شود. به این منظور مواد دیواره باید به‌درستی انتخاب شوند. ماده دیواره باید قابلیت تشکیل فیلم را به‌خوبی دارا باشند. هم‌چنین در میزان بالای مواد جامد، ویسکوزیته پایینی داشته باشند، قدرت جذب رطوبت آن‌ها پایین باشد و از لحاظ اقتصادی مقرون‌به‌صرفه باشند.

هیدروکلوئیدهای غذایی مانند ژلاتین، صمغ‌های گیاهی، نشاسته اصلاح شده، دکستروز به‌عنوان مواد دیواره مناسب می‌باشند. هنگامی که مخلوطی از مواد دیواره انتخاب شد، هیدراته شده و سپس ماده دیواره با ماده

¹ Centrifugal suspension separation

² Co Crystallization

³ Liposome entrapment

⁴ Interfacial polymerization

⁵ Molecular inclusion

⁶ Nano particulate delivery systems

هسته معمولاً به نسبت ۴ به ۱ مخلوط می‌شوند. مواد هسته برای کپسوله شدن با مواد دیواره هموژنیزه شده، مخلوط به خشک کن پاششی تغذیه‌شده و از طریق نازل به صورت ذرات ریز به داخل محفظه خشک کن پاشیده می‌شود. کپسول‌ها پس از سقوط به پایین خشک‌کن، جمع‌آوری می‌شوند. شکل معمولی ذرات خشک‌شده پاششی کروی است و اندازه آن‌ها $10-100 \mu\text{m}$ می‌باشد [۱۶]. به‌طور کلی خشک کردن پاششی دارای ۴ مرحله می‌باشد که شامل ریز سازی بخار مایع، تبخیر و خشک کردن از طریق گاز خشک، تشکیل ذره و متعاقباً جداسازی و جمع‌آوری ذرات است.

۱-۳-۲- سرد کردن پاششی

این روش مشابه خشک کردن پاششی است. مواد هسته در مواد مایع دیواره پخش شده و از طریق نازل‌هایی که دمای محیط اطرافش کنترل شده است به درون محفظه پاشیده می‌شود. این روش دو تفاوت عمده با خشک کردن پاششی دارد: در اینجا مواد پوشش‌دهنده چربی (روغن گیاهی یا مشتقاتش) می‌باشد و از هوای سرد به جای هوای داغ استفاده می‌شود. به علت آب‌گریز بودن مواد پوشش‌دهنده، ریز کپسول تولیدشده در آب نامحلول می‌باشد. در نتیجه این روش برای درون پوشانی کردن مواد هسته محلول در آب مثل مواد معدنی، ویتامین‌های محلول در آب، آنزیم‌ها و بعضی از طعم‌ها به کار برده می‌شود. از معایب این روش می‌توان به برهم‌کنش بین چربی و جز فعال اشاره کرد [۱۲].

۱-۳-۳- پوشش دهی بسترسیال

در این روش ذرات جامد در یک اتاقک بر روی بستر مشبک به کمک دمش رو به بالای هوای گرم یا سرد به صورت معلق درمی‌آیند. مواد دیواره مورد استفاده در این روش شامل مشتقات سلولز، دکسترین‌ها، امولسیفایرها، لیپیدها، مشتقات پروتئینی و نشاسته می‌باشند که به شکل ذوب‌شده یا حل شده در یک حلال قابل تبخیر استفاده می‌شوند. مواد دیواره از طریق سوراخ‌های پاشش پنوماتیکی که در بالای اتاقک

قرار گرفته، به صورت قطرات بسیار ریز به سمت پایین جریان پیدا می کنند و به شکل لایه نازکی روی سطح مواد هسته معلق شده می نشینند. تلاطم هوا برای معلق نگه داشتن ذرات پوشش داده شده کافی است، لذا امکان معلق شدن و پوشش دهی یکنواخت را به آنها می دهد. جهت نیل پوشش دهی خوب و تکمیل فرآیند ۱۲-۲ ساعت زمان لازم است [۱۲].

۱-۳-۴- روش گنجایش مولکولی

به طور کلی در این روش از سیکلودکسترین ها به عنوان مواد کپسول استفاده می شود. سیکلودکسترین ها از مشتقات نشاسته می باشند که از ۶، ۷ یا ۸ مولکول گلوکز به شکل حلقوی به یکدیگر متصل شده اند که بر اساس تعداد واحدهای گلوکز به ترتیب آلفا، بتا و گاما سیکلودکسترین نامیده می شوند. در این میان بتاسیکلودکسترین کاربرد بیشتری دارد. یکی از مزیت های برجسته گنجایش مولکولی، بهبود حلالیت آبی ترکیباتی نظیر پلی فنول ها یا ترکیبات کم محلول در آب می باشد [۱۳].

۱-۳-۵- روش تبلور (کریستالیزاسیون)

کریستالیزاسیون خودبه خود و سریع محلول ساکارز فوق اشباع، در دماهای بالا (بالای ۱۲۰ درجه سانتی گراد) و رطوبت کم (بریکس ۹۷-۹۵) حاصل می شود. اگر یک ذره ثانوی در فواصل زمانی یکسان اضافه شود، کریستالیزاسیون خودبه خودی باعث جا دادن ذره ثانوی در فضاهای خالی بخش داخلی کریستال های ریز و متراکم شده می شود. مزایای عمده و اصلی روش تبلور عبارتند از بهبود حلالیت، قابلیت مرطوب کنندگی، همگن شدن، قابلیت پراکنش، هیدراسیون، پایداری و قابلیت روان شدن مواد درون پوشانی [۱۳].

۱-۳-۶- روش توده ای

روش جدایی فازی در محلول آبی پیچیده یکی از قدیمی ترین و ساده ترین روش های کپسوله کردن داروها

برای آزادسازی دارو به صورت پایدار است. به خاطر شرایط آماده‌سازی ساده مانند استفاده از حلال غیر سمی و هم زدن کم، از آن‌ها در کپسوله کردن پروتئین و سلول‌های انسانی استفاده می‌شود. جدایش فازی در محلول آبی پیچیده، واکنش بین دو پلیمر با بار مخالف را درگیر می‌سازد تا یک ناحیه پلیمری ضعیف و یک ناحیه پلیمری غنی را نتیجه دهد. ناحیه پلیمری غنی برای روکش هسته ذرات استفاده می‌شود. کپسوله کردن داروها، سلول‌های زنده و آنزیم‌ها از این دست می‌باشد. کاربرد گسترده آن در آزادسازی دارو، عامل‌های بیولوژیکی و طعم‌دهنده‌ها می‌باشد که فعل‌وانفعال بین ذرات آنیونی و کاتیونی را درگیر می‌سازد [۱۳].

۱-۳-۷- تکنیک بارش نانو

در این روش مواد فعال و یک پلیمر در یک محلول آلی مخلوط می‌شوند. مخلوط حاصل به صورت قطره‌های ریز به یک محلول آبی (معمولاً یک سورفکتانت) افزوده می‌گردد. ذرات نانو در خلأ پراکنده شده و به شکل بخار درمی‌آیند تا حلال آلی حذف شود. سپس سانترفیوژ یا فیلتر می‌شوند [۱۳].

۱-۴- فناوری نانو در صنایع غذایی

نانوفناوری^۱، به کاربرد و استفاده از مواد و ذرات با ابعاد کمتر از ۱۰۰۰ نانومتر گفته می‌شود که در این مقیاس، ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی مواد تفاوت اساسی با ویژگی‌های ذرات در مقیاس‌های بزرگ‌تر دارد و شناخت ما را از پدیده‌های زیستی و فیزیکی در مواد غذایی دگرگون می‌سازد.

فناوری نانو، کاربردهای فراوانی در صنعت غذایی، دارویی، آرایشی و بهداشتی دارد که از جمله کاربردهای آن در صنایع غذایی می‌توان به استفاده در مواد بسته‌بندی، کشاورزی، فرآیندهای تولید غذا و مواد ضد-میکروبی اشاره نمود. فناوری نانو در بخش نگهداری غذا، با پوشش دهی سطح مواد از ورود هر نوع

¹ Nano technology

میکروارگانیزم به غذا جلوگیری می‌کند و سبب ضدعفونی شدن سطوح غذا می‌شود. در بخش غذا نیز با استفاده از فناوری نانو امکان اعمال تغییر در مواد غذایی و اضافه کردن افزودنی‌های موردنظر در اندازه‌های بسیار ریز و دست‌کاری محتویات فیزیکی مواد غذایی وجود دارد تا ویژگی‌های کاربردی آن‌ها را به سمت سودمندتری تغییر دهند و در نتیجه کیفیت مواد غذایی و هضم و جذب غذا در بدن بهبود یافته و محصولات جدید با طعم‌ها و رنگ‌های مختلف حاصل شود. همچنین با تولید نانوذرات خوراکی و افزودن ترکیبات ضروری و موردنیاز بدن به محصولات غذایی، سبب بهبود کیفیت مواد غذایی و هضم و جذب بهتر غذا در بدن می‌شود [۱۷]. علاوه بر این با پوشش دهی ترکیبات حساس و مواد بی‌ثباتی مانند آنتی‌اکسیدان‌های حساس و ویتامین‌ها از آن‌ها محافظت کرده و تا رسیدن به سلول‌های هدف، به صورت غیرفعال در بدن باقی می‌مانند. تولید محصولات جدید با طعم‌ها و رنگ‌های مختلف نیز از طریق فناوری نانو در صنعت غذا امکان‌پذیر می‌باشد [۸].

با کاهش اندازه ذرات از مقیاس میکرو به نانو، ذرات از ابعاد سلولی کوچک‌تر شده و در نتیجه نیروهای چسبندگی و سطح تمام ذرات و زمان عبور آن‌ها از دستگاه گوارش، نفوذپذیری در روده و حلالیت در هر دو فاز آلی و آبی افزایش می‌یابد؛ بنابراین زیست‌دسترسی ترکیبات زیست‌فعال^۱ افزایش می‌یابد [۱۸]. در واقع ترکیبات غیرقابل حل در آب یا روغن در مقیاس نانو به راحتی حل می‌شوند، حتی این امکان وجود دارد موادی که عموماً پس از مصرف در معده آزاد می‌شوند، به صورت آزاد نشده به سمت روده هدایت شوند و از آنجا مستقیماً جذب شده و وارد گردش خون شوند [۸].

۱-۵- روش‌های ساخت نانوذرات

¹ Bioactive Compounds

از سه مسیر می‌توان به ذرات در مقیاس نانو دسترسی پیدا کرد: ۱- روش بالا به پایین^۱ ۲- روش پایین به بالا^۲ ۳- روش ترکیبی.

در نوع اول ساختارهای نانو از طریق روش‌های مکانیکی و با شکستن توده مواد تشکیل شده و در نوع دوم که عموماً آن را فناوری مولکولی نیز می‌نامند، ساختارها با توجه به توانایی مولکول‌ها در ایجاد پیوند بین یکدیگر ساخته می‌شوند. این روش درست در جهت مخالف روش بالا به پایین می‌باشد و در این روش مواد نانو با استفاده از به هم پیوستن بلوک‌های سازنده مانند اتم‌ها و مولکول‌ها و قرار دادن آن‌ها در کنار یکدیگر و یا با استفاده از خودآرایی^۳، تولید می‌شوند. خودآرایی عبارت است از طراحی مولکول‌ها و ابر مولکول‌ها که اساس تشکیل آن‌ها مکمل بودن شکل ساختاری است. باید توجه داشت که اتم‌ها و مولکول‌ها همیشه درجایی قرار خواهند گرفت که کمترین انرژی آزاد را داشته باشند. در روش ترکیبی نیز نانوذرات از ترکیب دو روش فوق تشکیل می‌شوند، مانند شکستن قطرات روغن با روش‌های مکانیکی و سپس پوشاندن آن‌ها با بیوپلیمرها [۱۹].

روش‌های مختلفی جهت سنتز نانوذرات وجود دارد که از جمله می‌توان به روش‌های رسوب‌گذاری شیمیایی فاز بخار^۴ (CVD)، سل-ژل^۵، رسوب‌دهی لیزری پالسی^۶، کندوپاش^۷، تکنیک‌های هیدروترمال^۸، ترسیب شیمیایی^۹ اشاره کرد؛ اما از روش‌های شیمیایی به علت آسان بودن، تکرارپذیر بودن و مقرون‌به‌صرفه بودن

1 Top Down

2 Bottom Up

3 Self-assembly

4 Chemical Vapor Condensation

5 Sol Gel

6 Pulse Laser Deposition

7 Sputtering

8 Hydrothermal Technic

9 Chemical Precipitation Synthesis

بیشتر استفاده می‌شود. در میان روش‌های شیمیایی نیز روش سونوشیمیایی^۱ یا استفاده از امواج فراصوت^۲ نیز ساده‌تر، کم‌هزینه‌تر و در نتیجه مطلوب‌تر می‌باشد [۲۰].

۱-۵-۱- روش سل-ژل

فرآیند سل-ژل یک روش شیمیایی مرطوب^۳ و یک روش پائین به بالا برای سنتز انواع نانوساختارها به‌ویژه نانوذرات اکسید فلزی می‌باشد که می‌تواند نانوذراتی با کیفیت بالا و اندازه یکسان در حجمی بالا تولید نماید. به‌طور کلی فرآیند سل-ژل عبارت است از انتقال سیستمی از یک فاز سل مایع به یک فاز ژل جامد. در این روش پیش ماده مولکولی در آب یا الکل حل شده و با حرارت و هم زدن در اثر هیدرولیز به ژل تبدیل می‌شود. سپس ژل حاصل را خشک و پودر می‌نمایند. پودر حاصله را جهت کلسینه شدن^۴ حرارت می‌دهند. این روش ارزان بوده و به دلیل دمای پائین واکنش می‌توان کنترل مناسبی بر ترکیب شیمیایی محصولات داشت. سل ژل می‌تواند نانوذراتی با کیفیت بالا (تولید ذرات با اندازه یکسان) را در حجمی بالا تولید کند. این روش قادر است هم‌زمان دو یا چند نوع نانوذره را با هم تولید کند [۱۵].

۱-۵-۲- تکنیک‌های هیدروترمال

روش هیدروترمال یکی از پرکاربردترین روش‌های از پائین به بالا برای تولید نانوساختارهاست که بر پایه شکل‌گیری و رشد کریستال‌ها در اثر واکنش‌های شیمیایی و تغییرات قابلیت انحلال مواد در یک محلول آبی تحت دما و فشار مناسب شناخته می‌شود. در گذشته سنتز هیدروترمال در دما و فشار بالا و بیشتر در حالت بحرانی صورت می‌گرفت، اما امروزه با شناخت حلال‌های مناسب برای هر واکنش و با کمک روش‌های

¹ Sonochemical

² Ultrasound

³ Wet Chemical Method

⁴ Calcination

جدید انرژی‌دهی به سیستم (مانند استفاده از امواج ماکرو و یا میدان‌های مغناطیسی) این روش در دما و فشارهای پایین‌تر نیز استفاده می‌شود. در این روش ابتدا واکنش‌دهنده‌ها در حلال مناسب حل می‌شوند. در صورت نیاز برای حل شدن یا توزیع بهتر پیش ماده‌ها در محلول از امواج اولتراسونیک استفاده می‌شود. سپس محلول مواد اولیه درون اتوکلاو ریخته شده و اتوکلاو حاوی محلول واکنش‌دهنده‌ها تا دمای مناسب حرارت داده می‌شود. در اثر حرارت دهی فشار درون اتوکلاو بالا رفته و شرایط مناسب جهت واکنش پیش ماده‌ها فراهم می‌شود. پس از گذشت زمان کافی برای انجام واکنش شیمیایی درون اتوکلاو، حرارت دهی متوقف شده و محصولات بیرون آمده و در صورت نیاز برای خشک یا کلسینه شدن حرارت دهی می‌شوند. کلسینه کردن به عملیات حرارتی گفته می‌شود که در غیاب هوا و اکسیژن، بر روی مواد جامد برای تجزیه حرارتی، انتقال فاز و یا حذف مواد فرار اعمال می‌شود. با افزایش زمان کلسینه کردن همراه با بلوری شدن ذرات، به هم چسبیدگی و کلوخه شدن آن‌ها نیز اتفاق می‌افتد. از این رو زمان کلسینه کردن در ساختار بلوری و ابعاد ذرات تولیدی موثر است [۲۱].

۱-۵-۳- رسوب‌دهی لیزر پالسی

فرآیندی است که شامل رسوب نشانی مواد جدا شده از سطح، توسط لیزر بر روی زیر لایه می‌باشد. فرآیند اصلی شامل سه مرحله است:

جدا کردن مواد از سطح ماده هدف توسط لیزر به وسیله پالس‌های لیزری متناوب و پر قدرت. دور کردن سریع مواد یونیزه شده از ماده هدف. رسوب نشانی و رشد مواد تبخیر شده بر روی زیر لایه گرم شده.

یک پرتو پر قدرت لیزر، به‌طور متناوب به یک ماده هدف برخورد کرده و منجر به سایش لحظه‌ای و یونیزاسیون اتم‌های سطح می‌شود. این اتم‌ها، الکترون‌ها و یون‌ها که به سرعت در حال دور شدن از ماده

هدف می‌باشند، به سطح زیر لایه برخورد می‌کنند [۲۲].

۱-۵-۴- رسوب‌گیری شیمیایی

فرآیند رسوب‌گیری شیمیایی مراحل هسته‌زایی و رشد را دربردارد. کنترل همین دو مرحله است که منجر به تولید محصولات باکیفیت می‌گردد. فوق اشباعیت عامل اصلی در این دو مرحله می‌باشد. همچنین فرآیندهای ثانویه‌ای مثل عمل‌آوری استوالد، باز پخت و کلسینه کردن می‌توانند منجر به کلوخه شدن و رشد ناخواسته اندازه ذرات شوند. کنترل دقیق متغیرهای سنتز و همچنین استفاده از عوامل پایدارکننده می‌تواند کیفیت محصول نهایی را بالا ببرد [۲۳].

۱-۵-۵- روش سونوشیمیایی یا اولتراسوند

پدیده فیزیکی مسئول فرآیند سونوشیمیایی، هم زدن مایع با استفاده از امواج مافوق صوت می‌باشد. فرآیندی که در اثر اعمال امواج فراصوت به محلول اتفاق می‌افتد، شامل تشکیل، رشد و متلاشی شدن حبابی است که در اثر هم زدن صوتی در محلول شکل می‌گیرد و تحت عنوان حفره‌زایی^۱ شناخته می‌شود و منجر به ایجاد دمای موضعی بسیار بالا در محلول می‌گردد. بر طبق مکانیسم، گرم‌ترین نقطه در اثر متلاشی شدن حباب، دمای خیلی بالایی به دست می‌آید و فشار هم تا چند صد اتمسفر افزایش می‌یابد که این شرایط باعث شکسته شدن پیوندهای شیمیایی می‌شود.

امروزه دستگاه‌های متفاوت و بسیار زیادی جهت انجام عملیات سونوشیمیایی در دسترس می‌باشد که از نظر مکانیسم ایجاد امواج فراصوت ساختار مشابهی با یکدیگر دارند. ایجاد امواج فراصوت در این دستگاه‌ها به وسیله ترکیباتی تحت عنوان سرامیک‌های پیزوالکتریک^۲ صورت می‌گیرد که می‌توان آن‌ها را اصلی‌ترین جز آن‌ها دانست. ترکیبات پیزوالکتریک می‌توانند انرژی الکتریکی را به یک موج مکانیکی مثل صوت یا

¹ Cavitation

² Piezoelectric

انرژی ناشی از فشار و بلعکس تبدیل نمایند. به‌طورکلی دستگاه‌های مورد‌استفاده جهت فرآیندهای سونوشیمیایی به دو دسته میله‌ای^۱ و حمام فراصوت^۲ تقسیم می‌شوند. دستگاه‌های میله‌ای معمولاً از یک میله شیبور مانند از جنس تیتانیوم بهره می‌برند که درون محلول واکنش قرار گرفته است. دستگاه‌های میله‌ای عموماً از قدرت فراصوت بالاتری برای انجام واکنش‌های شیمیایی مخصوصاً سنتز نانوذرات برخوردارند. درحالی‌که حمام‌ها بیشتر برای مقاصد همگن‌سازی محلول‌ها و پاک‌سازی سطوح کوچک مورد‌استفاده قرار می‌گیرند.

همان‌طور که گفته شد یکی از موردتوجه‌ترین کاربردهای سونوشیمیایی سنتز نانومواد است. دلیل این توجه خاص اثرات امواج فراصوت روی واکنش‌های سنتزی است. از این جمله می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

افزایش سرعت و بازده واکنش، استفاده بهینه از انرژی، فعال‌سازی سطوح فلزی و جامدات، ایجاد بهبودهایی در سنتز نانوذرات، توانایی ایجاد پوشش همگن نانوذرات بر روی بسترهای مختلف و هم‌چنین بهبود عملکرد کاتالیزورهای انتقال فاز [۲۴].

مکانیسم شکل‌گیری و رشد نانو مواد با استفاده از روش‌های سونوشیمیایی و بهره‌گیری از امواج فراصوت بر اساس سه مرحله کلی توضیح داده می‌شوند: ۱- هسته‌زایی^۳ که طی آن و در اثر اعمال امواج فراصوت، واکنش میان مواد اولیه منجر به تشکیل هسته‌های اولیه می‌شود. ۲- رشد ذرات که طی آن مواد اولیه به سطح هسته‌های اولیه نفوذ کرده و بعد از واکنش با یکدیگر روی سطح آن رسوب می‌کنند و به‌این ترتیب به آن متصل می‌شوند. ۳- رسیدن به اندازه موردنظر و جداسازی از محلول حاوی مواد اولیه جهت جلوگیری از افزایش اندازه نانوذرات و کنترل خواص آن‌ها [۲۵].

¹ Probe

² Ultrasonic Bath

³ Nucleation

انتخاب مناسب فرآیند، امولسیفایرها و دیگر ترکیبات مورد استفاده، مهم‌ترین عامل جهت به‌دست آوردن ذراتی با اندازه و رنگ مطلوب برای هر کاربردی است. البته کنترل دقیق و درست فرآیند نیز در طول فرآیند تولید نانوذرات ضروری است [۲۶].

۱-۶- سیستم‌های نانو حامل

یکی از رایج‌ترین زمینه‌های کاربرد نانوذرات در صنایع غذایی و دارویی، استفاده از آن‌ها به‌عنوان حامل‌هایی برای مواد غذا-دارو و زیست فعال است [۲۷]. نکاتی که در مورد حامل‌ها باید مورد توجه قرار گیرد، این است که به‌منظور مؤثر بودن سیستم‌های انتقالی، ترکیبات فعال کپسوله کننده باید به مکان‌های مشخص برسند، غلظتشان در یک سطح مناسب برای مدت زمان طولانی ثابت بماند و از تجزیه نابهنگام آن‌ها جلوگیری شود. همچنین باید از مواد طبیعی تهیه شوند و از نظر ایمنی و سلامتی (GRAS)^۱ قابل قبول، ارزان قیمت و دارای اندازه نانو باشند. علاوه بر این، اثر مضر بر ویژگی‌های حسی سیستم‌های غذایی نداشته باشند [۲۸]. نانوکپسول‌ها دسته‌ای از نانوحامل‌ها هستند که فرآیند ساخت آن‌ها از روی عملکرد غشای سلولی در طبیعت الگوبرداری شده و دارای فضایی خالی برای به دام انداختن ترکیبات مغذی هستند و لایه بیرونی این کپسول‌ها، بسته به این که لازم است مواد داخل کپسول در آب یا در روغن حل شوند، طراحی می‌گردند [۲۹].

روش تهیه نانوحامل کلوئیدی با توجه به عوامی از قبیل خصوصیات فیزیکوشیمیایی مواد حامل، ماهیت محیط اطراف نانوحامل‌ها، غلظت مؤثر مواد به دام افتاده و سمیت آن‌ها، فرآیندهای انجام شده در طول عملکرد یا تحویل مواد توسط نانوحامل‌ها، اندازه بهینه و ماندگاری ذرات جهت کاربردهای مورد نظر و امکان تولید نانوحامل سالم، کارا و مؤثر در مقیاس‌های بزرگ انتخاب می‌شود [۳۰].

¹ Generally Recognized as Safe

سیستم‌های نانوحامل را به دو دسته بیوپلیمری (پروتئینی و پلی‌ساکاریدی) و حامل‌های بر پایه لیپید طبقه‌بندی می‌نمایند. آن‌ها عموماً متشکل از یک دیواره یا غشا فیزیکوشیمیایی محافظ و یک هسته فعال هستند و از روی عملکرد غشای سلولی در طبیعت الگوبرداری می‌شوند. از این سیستم‌ها برای پوشاندن و درون پوشانی ترکیبات مختلف در صنایع غذایی از جمله ترکیبات ویتامینی، مواد مغذی، ترکیبات آنتی-اکسیدانی، مواد ضد میکروبی، طعم‌دهنده‌ها و هم‌چنین باکتری‌های مفید استفاده می‌شود. لایه بیرونی این کپسول‌ها بسته به این که مواد داخل کپسول در آب یا روغن حل شوند، طراحی می‌شود [۲۹]. نانوحامل‌ها بر پایه لیپیدی شامل نانوامولسیون‌ها، امولسیون‌های چندگانه^۱، میکروامولسیون‌ها^۲، نانولیپوزوم‌ها و نانو ذرات لیپیدی و ذرات هیدروژل پر شده^۳ (شکل ۱-۱) و نانوحامل‌های بر پایه پلیمری شامل بیوپلیمرهایی از جمله پروتئین و پلی‌ساکارید و هم‌چنین کمپلکس حاصل از مخلوط این دو نوع بیوپلیمر هستند [۳۱].



شکل ۱-۱: انواع سیستم‌های حامل بر پایه لیپیدی (مکلمنتز و لی، ۲۰۱۰).

در میان این سیستم‌های پلیمری آن‌هایی که بر پایه پروتئین هستند کاربرد بیشتری دارند؛ زیرا پروتئین‌ها دسته‌ای از ماکرومولکول‌های طبیعی می‌باشند که دارای ساختار منحصر به فرد بوده و کاربرد بالقوه‌ای در

¹ Multilayer Emulsion

² Micro Emulsion

³ Filled Hydrogel Particles

زمینه بیولوژیکی دارا می‌باشند [۳۱]. هم‌چنین مزایای استفاده از نانوکپسول‌های بیوپلیمری برای ترکیبات غذا- دارویی آب‌گریز شامل موارد زیر است:

افزایش حلالیت ترکیبات آب‌گریز در نوشیدنی‌های آبی به علت آب‌دوست بودن بیوپلیمرها، حفاظت از این ترکیبات در برابر عوامل تخریب‌کننده محیطی مانند اکسیژن، نور، حرارت، دماهای بالا، pH های شدیداً اسیدی یا قلیایی، آنزیم‌ها و فلزات سنگین، رهایش کنترل‌شده ترکیبات فعال در مواد غذایی و بدن، جلوگیری از ایجاد بدطعمی و بدرنگی در مواد غذایی توسط این مواد، دسترسی زیستی بالاتر مواد به دلیل کاهش اندازه ذرات و در نتیجه افزایش سطح به حجم و جلوگیری از کاهش شفافیت محلول‌ها به دلیل کاهش اندازه ذرات و قطرات و در نتیجه کاهش شکست نور و کدورت می‌باشد.

نانومواد به‌دست‌آمده از پروتئین‌ها به‌ویژه نانوذرات پروتئینی، زیست‌تخریب‌پذیر، غیر سمی و غیر آنتی‌ژن بوده و پایداری بالایی دارند و فواید بسیاری از جمله ممانعت از بروز سرطان، بهبود سلامتی روده و کاهش کلسترول خون دارند [۳۲]. این نانوذرات اغلب جهت انتقال داروهای ضد سرطان و عوامل درمانی به بخش‌های خاصی از بدن به کار می‌روند بنابراین باید زیست‌سازگاری خوبی داشته و عاری از هرگونه ناخالصی و سمیت باشند.

به‌طور کلی دو روش عمده برای ساخت این نانوذرات (نانوذرات پروتئینی) گزارش شده است. تکنیک اول مبتنی بر تشکیل امولسیون آب در روغن. شبکه‌ای کردن ذرات به‌وسیله حرارت و یا روش‌های شیمیایی است. روش دوم مبتنی بر فرآیند جدایی فاز در محیط آبی (توده‌ای شدن) است که به دنبال آن شبکه‌ای کردن شیمیایی به‌منظور سخت کردن ذرات انجام می‌شود. عمده‌ترین عیب روش امولسیون‌یابی این است که به‌منظور حذف روغن و یا عامل پراکنش، ذرات باید با مقدار زیادی حلال شسته شوند و مشکل دیگر این است که به خاطر ناپایداری ذاتی امولسیون قبل از سخت کردن به‌وسیله گرما و یا عامل شبکه‌ای‌کننده،

امکان تهیه نانوذرات کوچک‌تر از ۵۰۰ نانومتر با توزیع اندازه باریک وجود ندارد، بنابراین از روش‌های جدایش فازی در محلول آبی و یا محلول زدا^۱ استفاده می‌شود. بسته به روش تهیه نانوذرات باقی‌مانده‌های سمی مختلف از جمله حلال‌های آلی، مونومرها، الکترولیت‌ها، فعال‌کننده‌های سطح^۲، کلوخه‌های پلیمری (نانوذرات به هم چسبیده) می‌تواند در مخلوط نانوذرات وجود داشته باشد. درجه جداسازی و خالص‌سازی ذرات بستگی به کاربرد نهایی نانوذرات دارد. اگرچه جدا کردن کلوخه‌های پلیمری به راحتی و توسط فیلتر کردن ساده انجام می‌شود، اما حذف بقیه ناخالصی‌ها مستلزم عملیات پیچیده است. ژل فیلتراسیون، دیالیز، اولتراسانتریفوژ از روش‌های متداول برای حذف این ناخالصی‌ها به شمار می‌رود [۳۳]. سانتریفوژها به عنوان یک دسته مهم از دستگاه‌های جداسازی، در انواع ته‌نشینی و فیلتری و به صورت پیوسته و ناپیوسته عمل می‌کنند، محدوده عملیاتی آن‌ها بسیار گسترده می‌باشد. جداسازی و خالص‌سازی مایعات، رطوبت‌زدایی و شستشوی جامدات، تقسیم‌بندی ذرات با توجه به اندازه آن‌ها، جداسازی و استخراج مایعات از جمله کاربردهای معمول این دستگاه‌ها می‌باشد. به‌طور کلی روش سانتریفوژ کردن عبارت است از جداسازی جامد از مایع تحت تأثیر نیروی گریز از مرکز بر اساس اختلاف دانسیته وزنی آن‌ها. در روش فیلتراسیون روش‌های جداسازی مبتنی بر اختلاف فشار است که از غشاها برای جداسازی اجزا، در محلول مایع و یا سوسپانسیون، بر اساس اختلاف در اندازه و بار ذرات، استفاده می‌کنند. فیلتراسیون به دو صورت امکان‌پذیر است: فیلتراسیون با جریان نرمال و فیلتراسیون با جریان افقی. اختلاف این دو مدل در جهت جریان خوراک است. در طول فیلتراسیون، خوراک به دو بخش تقسیم می‌شود: بخش باقی‌مانده که شامل ذراتی است که اندازه آن‌ها به قدری بزرگ است که نمی‌توانند از منافذ غشا عبور کنند و بخش تراوش شده که در حقیقت همان بخش از خوراک می‌باشد که از غشا عبور می‌کند. روش دیالیز نیز فرآیندی است که در آن ترکیب مواد حل شونده در یک محلول با در معرض قرار گرفتن با محلول دیگر که از طریق غشای نیمه‌تراوا از هم جدا

¹ Desolvation

² Surfactant

شده‌اند، تغییر می‌کند. مولکول‌های آب و مواد با وزن مولکولی کم می‌توانند از منافذ غشا عبور کرده ولی مواد با وزن مولکولی بالا مانند پروتئین‌ها نمی‌توانند عبور کنند.

تحقیقات نشان داده است که استفاده از کمپلکس بیوپلیمری پروتئینی و پلی‌ساکاریدی، پایداری و کاربرد آن‌ها را نسبت به بیوپلیمر تنها بهبود می‌بخشد. ایجاد برهمکنش‌های الکترواستاتیک و تشکیل کمپلکس‌های محلول بین پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها در صورتی به‌آسانی صورت می‌گیرد که pH محیط بین نقطه ایزو الکتریک پروتئین و pka پلی‌ساکارید باشد، زیرا در این صورت بارهای خالص الکتریکی بین دو بیوپلیمر مخالف یکدیگر بوده و جاذبه بین بارهای مخالف، سبب تشکیل کمپلکس می‌شود [۳۴].

۱-۷-انواع نانو حامل‌ها

۱-۷-۱-نانو کپسول‌های لیپیدی

۱-۷-۱-۱-لیپوزوم

لیپوزوم‌ها ذرات کروی تشکیل شده از لیپیدهای قطبی یا ترکیبی از لیپیدهای قطبی و کلسترول یا ارگوسترول هستند و به محض واکنش با آب به‌صورت سازمان یافته و به فرم غشاهای دولایه‌ای، تجمع می‌یابند. به دلیل وجود هر دو فاز لیپیدی و آبی در ساختار لیپوزوم‌ها، این حامل‌ها در انکپسوله کردن ترکیبات آمفی‌فیلیک، آب‌دوست و آب‌گریز به کار می‌روند و آن‌ها می‌توانند ترکیبات آب‌دوست را در هسته و ترکیبات آب‌گریز و آمفی‌فیل را در لایه لیپیدی به دام اندازند که این مزیت عمده لیپوزوم‌ها در مقایسه با اغلب سیستم‌های حامل می‌باشد. کنترل اندازه لیپوزوم‌ها و تعیین ویژگی مواد دیواره‌ای و بهبود آن‌ها از جمله مهم‌ترین پژوهش‌های انجام شده در سال‌های اخیر می‌باشد. نانولیپوزوم‌ها می‌توانند به دلیل سازگاری، زیست‌تخریب‌پذیری و عدم حضور ترکیبات سمی کاربردهای گوناگونی در صنعت داروسازی، آرایشی و

بهداشتی و صنایع غذایی داشته باشند [۳۵]. اندازه لیپوزوم‌ها بسته به روش تولید ۱۰ نانومتر تا ۱۰ میکرومتر است و مکانیسم تولید آن‌ها براساس برهم‌کنش نامطلوب بین ترکیبات آمفی‌فیلیک و مولکول‌های آب می‌باشد. ترکیبات آمفی‌فیلیک در حلال‌های قطبی مانند آب تمایل به تشکیل ساختارهای دو لایه‌ای دارند. این ساختارها در اثر نیروی برشی ناشی از سونیکاسیون، هموژنیزاسیون و حرارت دهی شکل منحنی به خود می‌گیرند و ویزیکول‌هایی را تشکیل می‌دهند که در آن گروه‌های سر قطبی فسفولیپیدها در معرض فاز آبی محیط درونی و بیرونی قرار می‌گیرد و دم‌های هیدروکربنی آب‌گریز در ساختار لایه‌ای قرار می‌گیرند. لیپوزوم‌ها بسته به نیروی برشی اعمال شده طی فرآیند ساختارهای مختلفی دارند [۳۶].

۱-۷-۱-۲-نانو امولسیون

امولسیون‌ها دیسپرسیونی از قطرات یک مایع در مایع دیگر هستند که این دو مایع قابل امتزاج با یکدیگر نمی‌باشند. از امولسیون‌ها برای طراحی و تولید سیستم‌ها تحویل لیپیدی استفاده می‌شود. نانوامولسیون‌ها دسته‌ای از امولسیون‌ها هستند که در آن اندازه ذرات فاز پراکنده کمتر از ۱۰۰۰ نانومتر می‌باشد. یک نانوامولسیون مطلوب از توزیع اندازه محدود، پایداری سنتیکی و شفافیت بالا برخوردار است. این سیستم یک محلول شفاف شامل آب، روغن و سورفکتانت است که از نظر ترمودینامیکی ناپایدارند. در این سیستم، ترکیب اجزا و شکل‌گیری آن‌ها به صورت خودبه‌خودی صورت می‌گیرد و انرژی برشی خیلی بالایی برای آماده‌سازی آن‌ها نیاز نیست. خواص مربوط به پایداری، رنگ و بافت امولسیون‌ها، به اندازه قطرات و توزیع اندازه ذرات آن‌ها بستگی دارد. امولسیون‌های روغن-آب-روغن و آب-روغن-آب، از انواع امولسیون‌های مضاعف هستند [۲۷]. جهت تولید نانوامولسیون‌ها از دو روش کم انرژی و پرانرژی استفاده می‌شود. در روش کم انرژی از تجهیزات ساده و ارزان استفاده می‌شود ولی برای تولید نانوقطرات به غلظت بالای سورفکتانت نیاز است. روش‌های پرانرژی به تجهیزات اختصاصی گران‌قیمت و هزینه‌های اجرایی نسبتاً بالا نیاز دارند اما

مزیت آن‌ها نسبت به روش‌های کم انرژی، توانایی تولید نانوامولسیون در غلظت پایین سورفکتانت می‌باشد [۳۷].

۱-۷-۱-۳-نانو ساختارهای لیپیدی جامد

این مواد شامل یک هسته لیپیدی جامد به همراه مواد فعال در یک ماتریکس لیپیدی است که در آن ذرات با یک لایه سورفکتانت پایدار می‌شوند. در واقع این حامل‌ها با تبدیل لیپید مایع در امولسیون‌ها به لیپید جامد به دست می‌آیند. این ذرات می‌توانند از نانوامولسیون‌ها و میکروامولسیون‌ها تشکیل شوند و اندازه این ذرات لیپیدی در محدوده ۵۰ نانومتر تا ۱ میکرومتر می‌باشد. ماده فعال زیستی می‌تواند به‌طور همگن هم در هسته و هم در پوسته بیرونی ذرات پایدار شود. این نانوذرات در مقایسه با نانوامولسیون‌ها و لیپوزوم‌ها مزیت‌هایی از جمله راندمان انکپسولاسیون بالا، عدم نیاز به حلال‌های آلی در تهیه آن‌ها، امکان تولید و استریلیزاسیون در مقیاس بالا، تخریب کندتر ماتریس جامد و در نتیجه رهاسازی ترکیبات فعال زیستی در زمان طولانی‌تر می‌شود. تحقیقات نشان داده است که استفاده از لیپیدهای کریستالی به‌جای لیپیدهای مایع، موجب افزایش کنترل انتشار و پایداری مواد فعال محصور شده است [۲۷].

۱-۷-۱-۴-میکرو امولسیون

هنگامی که سورفکتانت‌ها به آب افزوده می‌شوند بخش‌های غیرقطبی آن‌ها به‌هم‌پیوسته و در غلظت‌های بالای غلظت بحرانی، تشکیل توده‌های کلئیدی کروی به نام میسل را می‌دهند که این میسل‌ها می‌توانند مواد لیپیدی کم محلول یا نامحلول را احاطه نموده و در آب محلول می‌سازند که به این سیستم میکروامولسیون گویند. اگرچه این سیستم از نظر اندازه شبیه نانوامولسیون‌ها است اما برخلاف آن‌ها هیچ انرژی مکانیکی جهت تشکیل آن‌ها لازم نبوده و خودبه‌خود تشکیل می‌شوند و از نظر ترمودینامیکی پایدارند. هم‌چنین نسبت سورفکتانت به فاز پراکنده در این سیستم‌ها بیشتر است. میکروامولسیون‌ها علاوه بر

انکپسوله کردن ترکیبات لیئوفیل در هسته مرکزی خود، ترکیبات هیدروفیل را در لایه بیرونی قطبی خود انکپسوله می‌کنند [۳۸].

۱-۷-۲-نانو کپسول‌های پلیمری

در تولید نانوحامل‌های بیوپلیمری از پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها و یا کمپلکس بین آن‌ها استفاده می‌گردد. با استفاده از نانو کپسول‌های بیوپلیمری می‌توان ترکیبات مغذی را به دام انداخته و از آن‌ها در برابر شرایط نامساعد محیطی محافظت نمود. بیوپلیمرها هم‌چنین آب‌دوست هستند و برای حمل مواد مغذی در محصولات غذایی آبی مناسب به نظر می‌رسند. هم‌چنین از نظر غذایی، ارزش تغذیه‌ای بالایی دارند. گاهی در دسته فیبرهای غذایی قرار می‌گیرند. این ساختارها برخلاف نانوامولسیون‌ها با پیوند کووالانسی قوی به هم متصل شده و دارای استحکام بالاتری هستند. امروزه طیف وسیعی از پلیمرهای طبیعی و زیستی برای تولید نانوذرات بیوپلیمری و اغلب جهت کپسوله کردن مواد مغذی به کار می‌روند [۳۹].

۱-۷-۲-۱-نانولوله‌ها^۱

یکی از انواع نانو کپسول‌های پلیمری، نانولوله‌ها هستند که به‌عنوان حامل و پوشاننده ترکیبات غذا-دارو استفاده می‌شوند. نانولوله‌ها پتانسیل بالایی در افزایش ویسکوزیته دارند و می‌توانند ژل‌های شفاف تشکیل دهند [۳۷].

۱-۷-۲-۲-نانوحامل‌های پلی‌ساکاریدی

از آن‌جا که برخی پلی‌ساکاریدها، توانایی اتصال به سایر ترکیبات از جمله ترکیبات آب‌گریز را دارند، بنابراین به‌عنوان پوشش‌هایی مناسب برای درون پوشانی مواد ضروری به شمار می‌روند. این مواد آب‌دوست هستند

¹ Nano Tube

و با توجه به این خاصیت سبب افزایش حلالیت ترکیبات آب‌گریز در سیستم‌های آبی شده و از آن‌جا که نسبت به نفوذ اکسیژن مقاومند برای پوشش دهی ترکیبات حساس به آب و اکسیژن مناسب‌اند. برای استفاده از نانوکپسول‌های بیوپلیمری، باید خواص فیزیکی و شیمیایی آن‌ها را مدنظر قرار داد، زیرا ممکن است در اثر تغییر شرایط محیطی مثل دما، قدرت یونی محیط رفتار متفاوتی از خود نشان دهند [۳۷].

۱-۷-۲-۳- نانوحامل‌های پروتئینی

بیوپلیمرهای غذایی به‌ویژه پروتئین‌ها به دلیل ارزش تغذیه‌ای بالا و ایمنی و سلامتی در این زمینه مورد توجه قرار گرفته‌اند. با استفاده از نانوحامل‌های پروتئینی و پوشش‌دهی ترکیبات مغذی حساس، می‌توان از تخریب، اکسیداسیون و سایر برهم‌کنش‌های آنزیمی و شیمیایی در طول تولید و نگهداری جلوگیری کرد [۴۰].

۱-۸- نانوحامل‌های بر پایه ایزوله پروتئین سویا

در بین انواع پلیمرهای زیستی قابل‌استفاده برای تهیه نانوذرات در صنایع غذایی، پروتئین به‌ویژه پروتئین سویا بیشترین کاربرد را دارد. سویا به علت داشتن پروتئین و مواد مغذی در تغذیه انسان به کار می‌رود. سویا حاوی ۱۸-۲۱ درصد روغن، ۳۸-۴۲ درصد پروتئین، ۱۵ درصد قند نامحلول (فیبر رژیمی)، ۱۵ درصد قند محلول و ۱۴ درصد رطوبت می‌باشد. سویا از نظر ویتامین‌های گروه B بسیار غنی است و دارای مقادیری ویتامین‌های C، D، E، K و کمی کاروتن و کلروفیل می‌باشد. پروتئین سویا یک پروتئین با کیفیت بالاست، به این معنی که به‌طور کامل هضم می‌شود و ترکیب آمینواسیدی آن با الگوی آمینواسیدی موردنیاز انسان مطابقت دارد و تمام اسیدهای آمینه اصلی برای تغذیه انسان، هم‌چنین مقادیر قابل‌توجهی از لیزین را دارا می‌باشد. پروتئین‌های سویا شامل آل‌بومین، گلوتلین و گلوبولین است که بخش غالب آن گلوبولین می‌باشد. هم‌چنین پروتئین‌های سویا منبع سرشاری از ترکیباتی موسوم به ایزوفلاون‌هاست که در پیشگیری از

سرطان‌ها، پوکی استخوان و بیماری های قلبی نقش مهمی دارد [۴۱]. خواص عملکردی سویا بسیار چشم‌گیر است. حرارت، اسیدیته و هموژناسیون از مهم‌ترین فاکتورهایی است که بر خواص عملکردی آن اثر می‌گذارند. این پروتئین خواصی همچون تشکیل ژل، امولسیون‌کنندگی، خواص کف‌کنندگی، پراکندگی و حلالیت را دارا می‌باشد. پروتئین سویا در نقطه ایزوالکتریک خود دارای کمترین حلالیت است و در خارج از این محدوده حلالیت آن افزایش می‌یابد [۴۲]. ایزوله پروتئین سویا عبارت است از فراکسیون اصلی پروتئین سویا که پس از حذف غالب اجزای غیر پروتئینی تهیه می‌شود و میزان پروتئین آن بر مبنای وزن خشک نباید از ۹۰ درصد کم‌تر باشد. میزان چربی این ترکیبات به مقدار زیادی کاهش یافته است چراکه عمده روغن آن‌ها خارج شده است و نیز ایزوله پروتئین سویا عاری از کربوهیدرات می‌باشد. ایزوله پروتئین سویا در اسیدیته‌های ۷ تا ۹ بیشترین حلالیت را دارد. یکی از خواص عملکردی ایزوله پروتئین سویا، توانایی آن در تشکیل امولسیون پایدار در بسیاری از سیستم‌های غذایی مثل سوپ خامه‌ای، امولسیون‌های گوشتی، فرآورده‌های لبنی و سیستم‌های غذایی با چربی بالا است. پروتئینی که برای دستیابی به این خاصیت عملکردی مورد استفاده است باید حلالیت بالایی داشته باشد [۴۳].

درواقع پروتئین سویا و ایزوله آن به دلیل خواص عملکردی، هزینه پایین، در دسترس بودن و ارزش غذایی بالا به‌طور گسترده در تولید مواد غذایی استفاده می‌شوند و توانایی آن‌ها جهت تشکیل ژل به‌طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است [۴۴].

۱-۹- تشکیل ژل پروتئینی

تشکیل ژل پروتئینی کاربردهای صنعتی بسیاری دارد. توانایی تولید ژل یک خصوصیت مهم در بسیاری از غذاهای پروتئینی است و عموماً در محصولات غذایی مختلف مثل سوسیس، کاسترد، پنیر، ماست و دسرهای جهت دستیابی به خصوصیات حسی و بافتی مناسب کاربرد دارد. خصوصیات مکانیکی ژل‌ها در فیلم‌های

عکاسی و کپسول‌های دارویی اهمیت ویژه‌ای دارد. ژل‌ها شبکه‌ای به هم پیوسته از ذرات کوچک پروتئینی است که اندازه ذرات متغیر بوده و ژل‌های پروتئینی بسته به سایز و آرایش ذرات به دو گروه تقسیم می‌شوند. اولین گروه شامل رشته‌های باریک تشکیل شده از تجمع مولکول‌های با قطر کوچک می‌باشد که شبکه منظم پروتئینی را به وجود می‌آورند. این ژل‌ها عموماً شفاف بوده و توانایی نگهداری آب بالایی دارند. دومین گروه شامل ژل‌های تجمع یافته می‌باشد که شامل ذرات نسبتاً بزرگی می‌باشند که به هم متصل شده و شبکه پروتئینی را ایجاد می‌کنند. این ژل‌ها معمولاً به علت ذرات بزرگ کدر بوده و به علت وجود فضاهای مویرگی بزرگ توانایی نگهداری آب پایینی دارند. عواملی مثل غلظت پروتئین به کاررفته، نمک، pH و شرایط فرایند بر خصوصیات ژل‌ها اثرگذار می‌باشد [۴۵].

جهت تولید ژل، طبیعی است که شبکه‌ای از زنجیره‌های پروتئینی باید تشکیل شود تا بتواند مقادیر خاص از آب را در درون خود جای دهد. برای انجام این کار ضروری است که ساختمان درهم و پیچ‌خورده فضایی مولکول‌های پروتئینی باز شود تا امکان ارتباط و به هم پیوستگی میان زنجیره‌ها و همین‌طور میان آب و زنجیره‌ها از طریق گروه‌های عامل فراهم آید. بدیهی است دناتور شدن پروتئین می‌تواند چنین حالتی را به وجود آورد. دناتور شدن باعث تغییر در ساختمان پروتئین‌ها بدون شکستن اتصالات پپتیدی آن‌ها و تغییر در ترتیب اسیدهای آمینه می‌شود. دناتوراسیون فرآیندی تسهیل شونده است و زمانی که ضعیف‌ترین پیوند شکسته شد، ساختار پروتئین تضعیف شده و در نتیجه پیوندهای دیگر آسان‌تر شکسته می‌شود و پروتئین‌ها از حالت پیچ‌خورده و درهم‌تنیده خارج شده و شکلی باز و گسترده پیدا می‌کنند و بخش‌های آب‌گریز به سطح آمده و باعث کاهش حلالیت پروتئین می‌گردد. در میان نیروهای اتصال‌دهنده میان زنجیره‌ها، پیوندهای هیدروفوبی نقش مهمی ایفا می‌کنند؛ زیرا بعد از باز شدن زنجیره پروتئینی این‌ها که در حالت طبیعی در درون ساختمان فضایی پروتئین قرار دارند آزاد می‌گردند و زمینه را برای ایجاد پیوندهای زیادی

فراهم می‌سازند. به همین دلیل است که در pH ایزوالکتریک که نیروی دفع‌کننده‌ای در سطح کلی سیستم پروتئینی وجود ندارد، ژل تشکیل شده کم آب‌تر و سفت‌تر و دارای حجم کم‌تری می‌باشد.

روش‌های متعدد فیزیکی و شیمیایی جهت تشکیل ژل پروتئینی وجود دارد مثل حرارت دهی، اعمال فشار، اسیدی کردن، افزودن نمک، اتصالات عرضی شیمیایی یا آنزیمی و تشکیل ژل به روش ژله‌ای شدن سرد [۴۶].

۱-۱۰-۱- نانوژل‌های پروتئینی

نانوذرات پلیمری با شبکه سه‌بعدی در اندازه کم‌تر از صد نانومتر هستند که از طریق شبکه‌ای شدن زنجیر-های پلیمری به وسیله عوامل شبکه‌کننده شیمیایی یا فیزیکی تشکیل می‌شوند.

نانوژل‌ها محلول در آب هستند و به بارگذاری خودبه‌خودی دارو در محیط‌های آبی اجازه می‌دهند اخیراً نانوژل‌های مختلفی را از پلیمرهای طبیعی یا سنتزی تهیه می‌کنند که تمرکز خاصی روی کاربردهای زیست پزشکی دارند. نانوژل‌ها به تحریک‌کننده‌های خارجی مانند تغییرات دمایی، نور، میدان‌های مغناطیسی، pH، تغییرات خواص یونی، عوامل شیمیایی یا زیستی پاسخ می‌دهند و به همین دلیل نانوژل‌ها بهترین عملکرد را در کپسوله‌کردن و آزادسازی ترکیبات زیست فعال دارند.

نانوژل‌ها براساس ساختارشان طبقه‌بندی می‌شوند. انواع مختلفی از نانوژل‌ها مانند نانوژل‌های ساده، نانوژل‌های توخالی حساس به pH یا دما، نانوژل‌های هسته-پوسته، نانوژل‌های مویی، نانوژل‌های چندعاملی و چندلایه‌ای وجود دارد.

نانوژل‌ها را می‌توان در دو دسته بر اساس ساختار شبکه‌کننده‌شان طبقه‌بندی کرد:

شبکه کننده‌های شیمیایی (کووالانسی) نانوذله‌ها که به‌وسیله پیوند کووالانسی شبکه می‌کنند. معمولاً نانوذله‌های شبکه‌ای شده با روش شیمیایی، تحت شرایط رقیق شبکه کننده در واکنش با پلیمرهای محلول در آب مانند پلی‌ساکاریدها که با گروه‌هایی مانند گروه وینیلی و تیول اصلاح شده‌اند، سنتز می‌شوند.

شبکه کننده‌های فیزیکی نانوذله‌ها که با پیوندهای غیرکووالانسی مانند پیوند هیدروژنی، برهم‌کنش‌های الکترواستاتیکی و آب‌گریزی شبکه می‌کنند. نانوذله‌های شبکه شده به روش فیزیکی را می‌توان با استفاده از برهم‌کنش بین زنجیرهای پلیمری، مانند پیوندهای هیدروژنی، واندروالسی، الکترواستاتیکی و نیز برهم‌کنش‌های آب‌گریز به دست آورد. به‌طورمعمول، به‌دست آوردن نانوذله‌های پایدار شبکه‌ای شده به روش فیزیکی با اندازه‌های کنترل‌شده، با استفاده از پلیمرهای جمع کننده سخت است، زیرا برهم‌کنش غیرکووالانسی ضعیفی بین آن‌ها حاکم است. معمولاً نانوذرات دوگانه دوست خود انباشته قراردادی، مانند پلی‌صابون‌ها و پروتئین‌ها، دربردارنده تعداد فراوانی از گروه‌های آب‌گریز در زنجیرهای پلیمری هستند. در مقابل پلیمرهای اصلاح‌شده آب‌گریز با تعداد اندک گروه‌های آب‌گریز وجود دارد [۴۷].

۱-۱۱- ژله‌ای شدن به روش سرد

تشکیل ژل به روش ژله‌ای شدن سرد یک روش جدید جهت تولید ژل بر پایه پروتئین است که کاربردهای زیادی در محصولات غذایی حساس از لحاظ بافت و طعم دارد. به‌علاوه، ژله‌های تولیدشده به این روش می‌توانند به‌عنوان عامل قوام دهنده یا در درون پوشانی مواد فعال زیستی و حساس، درون شبکه پروتئینی به کار روند [۴۸]. ژله‌های پروتئینی اغلب در طول حرارت دهی ایجاد می‌شوند که به آن‌ها ژله‌های حرارت دیده گفته می‌شود اما در ژله‌ای شدن سرد تشکیل ژل در دمای اتاق صورت می‌پذیرد. تفاوتی که این ژله‌ها با ژله‌های تولیدشده در اثر حرارت دارند، در این است که در فرآیند دنا توره شدن، تجمع و تشکیل ژل در ژله‌های حرارت دیده، هم‌زمان با هم در طی فرایند حرارت دهی اتفاق می‌افتد، درحالی‌که در ژله‌های

تولیدشده به روش ژله‌ای شدن سرد، دنا توره شدن و تجمع در مرحله‌ای متفاوت با مرحله تشکیل ژل اتفاق می‌افتد [۴۹]. هم‌چنین این ژل‌ها قدرت ژلی و ظرفیت نگهداری آب بالاتری نسبت به ژل‌هایی که در اثر حرارت تشکیل ژل داده‌اند دارا می‌باشند [۹]. تشکیل ژل به روش ژله‌ای شدن سرد شامل دو مرحله متوالی است که در مرحله اول تجمع پروتئین‌ها در اثر حرارت محلول پروتئینی در مدت زمان معینی انجام می‌گردد. پس از خنک سازی، پروتئین‌های تجمع یافته به حالت محلول باقی مانده و می‌توانند چندین روز بدون ایجاد تغییرات عمده در اندازه تراکم پروتئین یا سایر ذرات نگهداری شوند. در مرحله دوم بعد از سرد شدن، تشکیل ژل در دمای اتاق از طریق کاهش دفع الکتروستاتیکی یا افزودن کلسیم، سدیم یا کاهش pH اتفاق می‌افتد. به تشکیل ژل در اثر کاهش pH ژل‌های اسیدی گفته می‌شود که در اثر اسیدی کردن آهسته و تدریجی، ابتدا محلول پروتئینی در pH دور از نقطه ایزوالکتریک بدون افزودن نمک حرارت داده می‌شود. بعد از خنک شدن یک تراکم پروتئینی پایدار ایجاد می‌گردد. افزودن اسید pH را کاهش داده و تشکیل ژل در دمای اتاق صورت می‌پذیرد. در این نوع ژل پیوند کووالانسی مهم‌ترین عامل سختی ژل می‌باشد [۵۰]. در اثر افزودن نمک در تشکیل ژل به روش ژله‌ای شدن سرد، یک ژل شفاف در دمای اتاق در اثر افزودن مقادیر نسبتاً کم نمک ایجاد می‌گردد. در اثر افزودن مقادیر نسبتاً زیاد نمک، ژلی کدر و دارای ذرات ریز ایجاد می‌گردد [۴۱]. با افزایش غلظت نمک کلرید کلسیم در pH=۷ کدورت ژل افزایش می‌یابد اما نسبت به بقیه نمک‌ها، کلسیم منجر به تشکیل ژل‌هایی شفاف‌تر می‌گردد [۴۹].

فصل دوم: مروری بر پژوهش‌های پیشین

۲-۱- تأثیر دما بر تشکیل ژل به روش ژله‌ای شدن و درون پوشانی

مارتین و جانگ (۲۰۱۲) از ژل‌های حاصل از ایزوله پروتئین آب پنیر جهت درون پوشانی آهن و غنی سازی مواد غذایی استفاده نمودند و جهت دستیابی به بهترین راندمان درون پوشانی، پروتئین تحت شرایط مختلف حرارت داده شد. حرارت دهی پروتئین در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ساعت سبب افزایش میزان آهن درون پوشانی شده در ژل پروتئینی نسبت به حرارت دهی در ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه می‌گردد. از طرف دیگر در pH خنثی رهایش آهن پائین و راندمان درون پوشانی آهن توسط ذرات ژل پروتئینی آب پنیر نسبت به pH اسیدی بالا می‌باشد [۵۱].

زین لو و همکاران (۲۰۱۰) به بررسی تأثیر دما روی ژل‌های ایزوله پروتئین سویا پرداختند و بیان نمودند که حرارت دهی در دماهای مختلف تأثیر قابل توجهی روی خاصیت ویسکوالاستیک ژل و توزیع پیوندها دارد. زمانی که حرارت دهی از ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد پایین‌تر باشد، پیوندهای ضعیفی بین پروتئین‌ها ایجاد شده و ژل ضعیفی تشکیل می‌گردد [۴۹].

ایکیان و تیلور (۲۰۰۹) در تحقیق خود امولسیون‌هایی با غلظت‌های مختلف ایزوله پروتئین آب پنیر و چربی شیر تهیه و در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه در pH خنثی حرارت دادند. امولسیون‌های حرارت دیده پایدار، از طریق اسیدی کردن یا افزودن کلرید کلسیم در دمای اتاق ژل پروتئینی به روش ژله‌ای شدن سرد را تشکیل دادند. نتایج نشان داد که تشکیل ژل و خصوصیات آن تحت تأثیر دمای حرارت دهی، اندازه قطرات امولسیون و غلظت پروتئین و چربی است. امولسیون‌هایی که اندازه قطرات آن‌ها کوچک می‌باشد قادر به تشکیل ژل هستند که به سهولت از طریق ژله‌ای شدن سرد حتی در غلظت‌های پائین پروتئین، ژل‌ها قادر به شکل‌گیری می‌باشند. افزایش دمای حرارت دهی سبب کاهش اندازه قطرات می‌گردد [۵۰].

۲-۲- تأثیر غلظت نمک، پروتئین و آهن بر تشکیل ژل به روش ژله‌ای شدن سرد و درون پوشانی

چانگ و همکاران (۲۰۱۳) به مقایسه خصوصیات ژل ایزوله پروتئین آب پنیر و مخلوط ایزوله پروتئین آب پنیر و نشاسته پرداختند. افزودن کلرید کلسیم منجر به ایجاد ژل در هر دو حالت در دمای اتاق می‌گردد و با افزایش غلظت آن کدورت افزایش می‌یابد. در مخلوط ایزوله پروتئین آب پنیر و نشاسته حضور گرانول‌های متورم نشاسته باعث تشکیل شبکه پروتئینی ناپیوسته شده و نهایتاً منجر به ژله‌ای شدن آهسته مخلوط در مقایسه با ژل‌های حاصل از ایزوله پروتئینی آب پنیر به تنهایی می‌گردد [۵۲].

ویلا و همکاران (۲۰۱۱) در تولید ژل پروتئینی خود از مخلوط ایزوله پروتئین سویا و صمغ ژلان به دو روش افزودن مستقیم نمک و انتشار نمک از طریق غشا استفاده نمودند.

ژل‌های حاصل از انتشار نمک کلرید کلسیم از طریق غشا قوی‌تر از ژل‌های تشکیل شده از طریق افزودن مستقیم نمک بودند؛ اما چنانچه در تولید ژل از نمک پتاسیم استفاده شود نتایج عکس مشاهدات به دست آمده می‌باشد. هم‌چنین در روش افزودن نمک به صورت مستقیم تشکیل ژل سریع‌تر روش انتشار نمک می‌باشد [۵۳].

کن و همکاران (۲۰۱۱) از مخلوط ایزوله پروتئین آب پنیر و صمغ دانه کتان جهت تشکیل ژل استفاده نمودند. تشکیل ژل در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد و با دو روش اختلاط نمک یعنی انتشار از طریق غشا و یا افزودن مستقیم نمک و نیز افزودن نمک کلرید کلسیم یا کلرید سدیم صورت پذیرفت. در ژل‌های حاصل از انتشار نمک کلرید کلسیم از طریق غشا ژل‌ها مستحکم‌تر و دارای توانایی نگهداری آب و تغییر شکل کمتری نسبت به نمونه‌های حاوی کلرید سدیم بودند. در روش افزودن نمک به صورت مستقیم در هیچ ژل حاصل از نمک سدیم یا کلسیم جداسازی فاز مشاهده نشد اما ژل حاصل از کلرید سدیم سختی و کشسانی

بیشتری داشتند. هم‌چنین با افزایش صمغ دانه کتان در هر دو حالت قدرت ژل و ظرفیت نگه‌داری آب کاهش می‌یابد [۵۴].

زین لو و همکاران (۲۰۱۰) در تحقیقی اثر یون‌های کلسیم روی خصوصیات ژل‌های تولید شده به روش ژله‌ای شدن سرد را بررسی نمودند و طبق نتایج حاصل بیان نمودند که این عامل تأثیر قابل‌توجهی روی خصوصیات بافتی ژل‌های تشکیل شده دارد. به‌گونه‌ای که افزایش غلظت یون کلسیم منجر به سنی و درشت شدن بافت ژل‌ها می‌گردد، هم‌چنین با افزایش غلظت یون کلسیم از ۲۰ تا ۳۰ میلی‌مولار استحکام ژل افزایش می‌یابد زیرا با افزایش یون‌های کلسیم پل‌های نمکی بین پروتئین‌های تجمع یافته افزایش می‌یابد اما در غلظت‌های بیشتر از ۳۳ میلی‌مولار استحکام ژل کاهش می‌یابد. علاوه‌براین در غلظت‌های یکسان کلرید کلسیم تحت تأثیر دماهای مختلف دو نوع ژل ایجاد می‌گردد: زمانی که دما کم‌تر از ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد باشد بافت ژل‌ها ضعیف می‌باشد اما در دماهای بالاتر از ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد ژل‌ها ساختاری رشته‌مانند پیدا می‌کنند [۴۹].

کن و همکاران (۲۰۱۰) به مقایسه اثر نمک کلرید کلسیم و کلرید سدیم بر خصوصیات ژل پروتئینی آب پنیر پرداختند. ژل‌های تولیدشده از طریق افزودن کلرید کلسیم سخت‌تر، الاستیک‌تر و کدرتر و دارای قابلیت نگه‌داری آب کم‌تری نسبت به ژل‌های تهیه‌شده از طریق افزودن کلرید سدیم می‌باشند. به‌علاوه طبق مشاهدات با افزایش غلظت ایزوله پروتئین آب پنیر تخلخل ژل کاهش اما سختی و ظرفیت نگه‌داری آب در آن افزایش می‌یابد [۵۵].

طبق گزارشات مالتیس و همکاران (۲۰۰۵) خصوصیات ژل پروتئینی سویا تحت تأثیر غلظت پروتئین و کلرید کلسیم می‌باشد. با افزایش غلظت کلرید کلسیم کدورت ژل افزایش اما توانایی نگه‌داری آب در ژل کاهش

می‌یابد. از طرف دیگر با افزایش غلظت پروتئین کدورت ژل کاهش و توانایی نگهداری آب در ژل بهبود می‌یابد [۵۶].

رومندتو و همکارانش (۲۰۰۲) جهت حفاظت از آهن در برابر شرایط محیطی از ژل پروتئینی بتالاکتوگلوبولین تشکیل شده به روش ژله‌ای شدن سرد استفاده کردند و بیان داشتند که رفتار الاستیک ژل در غلظت‌های بالای پروتئین و غلظت‌های پایین آهن افزایش می‌یابد و توانایی نگهداری آب در ژل در غلظت‌های پایین آهن بالاتر می‌باشد. همچنین نتایج نشان دادند که در نسبت‌های پایین آهن/ پروتئین، شبکه همگن رشته‌ای ایجاد می‌گردد، درحالی‌که در نسبت‌های بالای آهن/ پروتئین تجمع ذرات به صورت تصادفی می‌باشد [۵۷].

اندرسون و همکاران (۲۰۰۱) گزارش نمودند خصوصیات ساختاری ژل‌ها شدیداً تحت تأثیر غلظت پروتئین و پلی ساکارید می‌باشد و نوع نمک و سرعت اختلاط منجر به تشکیل ژل با ساختار و خصوصیات متفاوت می‌گردد [۵۸].

بریانت و همکاران (۲۰۰۰) جهت بررسی تأثیر کلرید سدیم و کلرید کلسیم در تهیه ژل پروتئینی آب پنیر محلول ۱۰٪ از این پروتئین تهیه و در ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه حرارت داده شد. سپس عمل سرد کردن تا ۳۰ درجه سانتی گراد انجام گردید. در مرحله بعد جهت ایجاد ژل ۰-۴۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم و ۰-۱۵ میلی‌مولار کلرید کلسیم افزوده شد. نتایج حاصله به این قرار بود که: هر دو نمک سبب افزایش کدورت و سختی ژل می‌شوند و با افزایش غلظت نمک سرعت تشکیل ژل و استحکام ژل نهایی افزایش می‌یابد و نمک کلرید کلسیم بیشتر از کلرید سدیم اثرگذار می‌باشد [۵۹].

بریانت و مک کلمنتز (۲۰۰۰) به بررسی اثر ساکارز در سرعت تشکیل ژل ایزوله پروتئین آب پنیر پرداختند. در این پژوهش آن‌ها ساکارز را قبل از افزودن نمک به ژل افزوده و گزارش نمودند که در غلظت‌های نسبتاً پایین ساکارز (حداکثر ۰.۸٪) سرعت تشکیل ژل به دلیل افزایش ویسکوزیته فاز مایع توسط ساکارز کاهش

می‌یابد اما در غلظت‌های بالاتر (بیشتر از ۸٪) سرعت تشکیل ژل افزایش می‌یابد که این امر می‌تواند به دلیل افزایش جاذبه بین پروتئین‌ها باشد [۶۰].

هانگ و همکاران (۱۹۹۹) در تحقیقی که بر روی تولید ژل پروتئینی آب پنیر انجام دادند به این نتیجه رسیدند که سرعت تجمع ایزوله پروتئینی آب پنیر وابسته به غلظت کلرید کلسیم است و افزایش غلظت کلرید کلسیم از ۱۰ میلی مول بر لیتر به ۳۰ میلی مول بر لیتر منجر به افزایش سرعت تجمع ایزوله پروتئین آب پنیر طی تشکیل ژل به روش ژله‌ای شدن سرد می‌گردد، اما زمانی که غلظت آن به ۱۲۰ میلی مول بر لیتر افزایش پیدا کند سرعت تجمع پروتئین‌ها کاهش می‌یابد [۶۱].

باربوت (۱۹۹۷) بیان نمود که با افزایش غلظت کلرید کلسیم در ژل پروتئینی آب پنیر سبب افزایش قدرت ژل می‌گردد اما شفافیت آن کاهش می‌یابد [۶۲].

باربوت و درک (۱۹۹۷) به بررسی تأثیر غلظت سدیم بر خصوصیات ژل ایزوله پروتئین آب پنیر تولیدشده به روش ژله‌ای شدن سرد و نیز تأثیر حرارت دهی مجدد ژل‌ها پرداختند. در محلول ۱۰٪ ایزوله پروتئین آب پنیر حرارت داده شده در ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه حداقل ۷۵ میلی مولار کلرید سدیم جهت تولید ژل نیاز می‌باشد. درحالی که در ژل تولیدشده به روش حرارت دهی ۲۵ میلی مولار کلرید سدیم نیاز می‌باشد. با افزایش کلرید سدیم از ۷۵ به ۴۰۰ میلی مولار در تولید ژل به روش ژله‌ای شدن سرد استحکام ژل و توانایی نگهداری آب افزایش می‌یابد درحالی که قابلیت ارتجاعی ژل کاهش می‌یابد. همچنین شفافیت ژل به دلیل افزایش اندازه پروتئین‌های متراکم بیشتر می‌شود. حرارت دادن مجدد ژل‌های تولیدشده به روش ژله‌ای شدن سرد قدرت ژل را افزایش می‌دهد و همچنین باعث افزایش کدورت، توانایی نگهداری آب می‌گردد [۶۳].

هانگ و همکاران (۱۹۹۷) بیان نمودند با افزایش غلظت ایزوله پروتئین آب پنیر از ۶٪ به ۱۰٪ کدورت ژل کاهش اما استحکام و ظرفیت نگهداری آب افزایش می‌یابد. همچنین در غلظت ۱۰٪ پروتئین با افزایش میزان کلرید کلسیم از ۵ به ۱۵۰ میلی مولار کدورت و استحکام ژل افزایش می‌یابد اما در غلظت‌های بالاتر از ۱۰٪ استحکام ژل کاهش می‌یابد. همچنین طبق نتایج به‌دست‌آمده در غلظت ۳۰ میلی مولار کلرید کلسیم به علت افزایش تجمع پروتئین‌ها ژل سخت‌تر می‌شود [۶۴].

هانگ و همکاران (۱۹۹۷) به مقایسه اثر NEM^۱ و کلرید کلسیم روی خصوصیات ژل ایزوله پروتئین آب پنیر پرداختند. با افزایش غلظت کلرید کلسیم کدورت و سختی ژل افزایش اما انسجام آن کاهش می‌یابد. با افزودن NEM تا غلظت ۲ میلی مولار کدورت و سختی ژل افزایش می‌یابد اما با افزایش غلظت آن به بیش از ۲ میلی مولار هر دو پارامتر کاهش می‌یابد [۶۵].

۲-۳- تأثیر pH بر تشکیل ژل به روش ژله‌ای شدن سرد و درون‌پوشانی

پلین و همکاران (۲۰۱۶) آهن را در ژل ایزوله پروتئین آب پنیر درون‌پوشانی نموده و جهت تخمین رهاش آهن به شبیه‌سازی شرایط معده و روده پرداختند. در شرایط معده تنها ۲۸٪ از آهن درون‌پوشانی شده آزاد شد، درحالی‌که در شرایط روده ۹۵٪ از آهن آزاد شد [۶۶].

اعظم عباسی و همکاران (۲۰۱۴) گزارش نمودند که با درون‌پوشانی ویتامین D در نانوذرات ایزوله پروتئین آب پنیر سبب پایداری بیشتر این ویتامین می‌گردد. غلظت‌های پایین ویتامین D تأثیر معکوس با پایداری آن دارد. هر چه میزان این ویتامین بیشتر باشد پایداری آن در طول نگهداری بیشتر است. همچنین طبق نتایج افزودن ویتامین D بر اندازه نانوذرات تأثیر داشته و باعث افزایش اندازه آن‌ها می‌گردد [۶۷].

¹ N-ethylalimide

کاوالیری و همکاران (۲۰۰۹) در تولید ژل پروتئینی خود از مخلوط پروتئین آب پنیر و پلی ساکارید استفاده نمودند. نتایج آن‌ها نشان داد تشکیل ژل و ساختار آن در ژل‌های مخلوط در $pH=5/8-5/6$ در یک‌زمان اتفاق می‌افتد. در حضور پلی ساکاریدها، تشکیل ژل باعث جدایی فاز بین پروتئین‌های تجمع یافته و مولکول‌های پلی ساکارید می‌گردد که رقابت بین تشکیل ژل و جدایی فاز منجر به ایجاد ساختار ژل می‌گردد. رقابت بین تشکیل ژل و جدایی فاز تحت تأثیر سرعت تشکیل ژل است که میزان ژله‌ای شدن نیز توسط سرعت اسیدی شدن کنترل می‌گردد که چنانچه سرعت اسیدی شدن پائین باشد ژل ساختاری درشت و زبر خواهد داشت اما زمان زیادی جهت جداسازی فاز وجود دارد [۶۸].

مالتیس و همکارانش (۲۰۰۹) از ژل پروتئینی سویا به‌عنوان حامل‌هایی جهت انتقال مواد فعال زیستی مثل ریبولوین استفاده کردند. ریبولوین به علت حلالیت پائین در آب به‌صورت کریستال در شبکه پروتئینی توزیع می‌گردد. نتایج به‌دست آمده نشان داد که میزان رهایش ریبولوین به pH بستگی دارد و رهایش آن در $pH=7$ سریع‌تر از pH اسیدی ($pH=2/5$) می‌باشد [۶۹]. در راستای این امر در تحقیقی دیگر از ژل‌های حاصل از قرص‌های پروتئین سویا جهت انتقال ریبولوین استفاده نمودند و نتایجی مشابه تحقیق قبل در مورد ژل‌های قرص پروتئین سویا به‌دست آوردند و بیان نمودند که ذرات ژل حاصل از ایزوله پروتئین سویا و قرص آن قادر به حفظ ریبولوین در شرایط معده و رهایش آن در روده می‌باشند [۷۰].

کاوالیری و همکاران (۲۰۰۸) از پروتئین آب پنیر جهت تولید ژل به روش ژله‌ای شدن سرد استفاده نمودند و جهت تشکیل ژل از GDL کمک گرفتند. در سرعت اسیدی شدن پائین ژل ساختار ناپیوسته‌تر، ضعیف‌تر و شبکه‌ای با خاصیت کشسانی کم‌تر تشکیل می‌دهد اما در سرعت اسیدی شدن بالاتر، ژل نسبت به دو فاز شدن غالب بوده و ساختار ژل نهایی تخلخل کم‌تری دارد اما سخت‌تر و کشسان‌تر می‌باشد [۷۱].

در نتیجه تحقیقات کاوالیری و همکاران (۲۰۰۷) ژل پروتئین آب پنیر از طریق افزودن گلوکونودلتا لاکتون به محلول پروتئینی دناتور شده از طریق حرارت آماده شد. پس از ۴۸ ساعت نگهداری در دمای ۱۰ درجه سانتی گراد، pH های نهایی متفاوتی (۵/۲-۳/۹) به دست آمد. نتایج نشان داد که توانایی نگهداری آب در ژل‌ها در pH نزدیک به نقطه ایزوالکتریک کاهش یافت که این امر به دلیل کاهش حلالیت پروتئین در این pH بود و در pH=۵/۲ ژل تشکیل شده استحکام بیشتری داشت. از طرف دیگر بتا لاکتوگلوبولین نقش مهمی در ثبات ژل به دلیل غلظت بالای آن در پروتئین ایزوله آب پنیر دارد و باعث تقویت ساختار ژل در نقطه ایزوالکتریک شده و ظرفیت نگهداری آب را بهبود بخشید [۷۲].

رومندتو و سویرید (۲۰۰۴) به بررسی تأثیر ساختار ژل ایزوله پروتئین آب پنیر روی رهایش آهن در شرایط شبیه‌سازی شده معده و روده پرداختند. نتایج نشان دادند، ژل‌هایی که دارای ساختار ذره‌ای و ریز بودند در شرایط اسیدی معده آهن بیشتری نسبت به ژل‌های دارای ساختار رشته‌ای بودند، آزاد کردند و در حالت قلیایی عکس این نتیجه اتفاق افتاد. در هر دو pH اسیدی و قلیایی هیدرولیز پروتئین اتفاق افتاد اما فقط در ژل‌هایی که دارای ساختار رشته‌ای بودند، رهایش آهن صورت پذیرفت. همچنین در ژل‌های دارای ساختار رشته‌ای ۲۸٪ از آهن در شرایط معده و ۹۵٪ آن در شرایط شبیه‌سازی شده روده آزاد شد [۷۳].

مارتین و جانگ (۲۰۰۱) تأثیر آسکوربات را در درون پوشانی آهن توسط ژل پروتئینی آب پنیر بررسی کردند و گزارش نمودند که آسکوربات در فرآیند تشکیل ژل تأثیر داشته و استحکام ژل در نسبت خاصی از آهن به آسکوربات افزایش می‌یابد. همچنین افزودن آسکوربات به ذرات ژل پروتئینی در افزایش جذب آهن مؤثر بوده و دسترسی زیستی به آهن از ۱۰٪ به ۸۰٪ افزایش می‌یابد [۹].

۲-۴- استفاده از اولتراسوند در تولید ژل به روش ژله‌ای شدن سرد

در تحقیقی عزیززی و همکاران (۲۰۱۶) بیان نمودند در اثر اعمال فرآیند فراصوت تا مدت زمان ۵ دقیقه برای نمونه‌هایی که نمک موجود در محیط پتاسیم کلرید باشد و تا زمان ۱ دقیقه برای نمونه‌هایی که نمک موجود در محیط سدیم کلرید باشد، باعث افزایش پیوستگی بافت می‌شود و در نتیجه شبکه‌ای یکدست و به هم پیوسته ایجاد می‌گردد [۷۴].

جهت تهیه ژل از کاپا کاراگینان^۱ حرارت دهی لازم است. عزیززی و فرحناکی (۲۰۱۳) در تحقیقی از اولتراسوند جهت تولید ژل به روش ژله‌ای شدن سرد استفاده کردند. با افزایش زمان اولتراسوند سختی ژل تا حد مشخصی افزایش می‌یابد، اما با افزایش بیش از حد زمان اولتراسوند سختی ژل کاهش می‌یابد. همچنین در ژل‌هایی که کلرید پتاسیم قبل از اولتراسوند افزوده می‌شود ضعیف‌تر از نمونه‌هایی بودند که کلرید پتاسیم بعد از فرآیند اولتراسوند افزوده می‌گردد [۷۵].

در تحقیقی دیگر عزیززی و همکاران (۲۰۱۳) به بررسی تشکیل ژل از هیدروکلوئید کاپا کاراگینان به روش ژله‌ای شدن سرد، در حضور یون‌های سدیم و استفاده از امواج فراصوت بدون استفاده از حرارت پرداختند. به منظور تشکیل ژل از دیسپرسیون‌های کاپا کاراگینان توسط تیمار فراصوت، از دستگاهی با فرکانس ۲۰ کیلوهرتز و دامنه ۱۰۰٪ استفاده شد. دیسپرسیون‌های کاپا کاراگینان در غلظت ۰.۴٪، در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد و برای مدت زمان‌های ۵-۱۲۰۰ ثانیه تحت تیمار فراصوت قرار گرفتند. با افزایش زمان اعمال فراصوت، میزان جذب آب و حلالیت در آب نمونه‌ها، افزایش و ویسکوزیته ذاتی آن‌ها کاهش یافت. افزایش مدت زمان اعمال فرآیند فراصوت تا زمان مشخصی (معمولاً ۵ دقیقه) باعث افزایش خواص ژل شد و بعد از آن باعث کاهش پارامترهای بافتی ژل‌ها شد [۷۶].

¹ Kappa Carrageenan

فرحناکی و همکاران (۲۰۱۳) به تشکیل ژل از ژلاتین با استفاده از فراصوت و بدون استفاده از روش‌های حرارتی پرداختند. ژل ژلاتین در اثر تیمار با فراصوت توانی (۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ وات) در مدت زمان‌های مختلف (۴۰، ۶۰، ۱۲۰، ۱۸۰ و ۲۴۰ ثانیه) در دمای ۱۳ درجه سانتی‌گراد تشکیل شد. خصوصیات مکانیکی ژل با افزایش مدت زمان و توان اعمالی امواج فراصوت، به میزان چشم‌گیری افزایش یافت. بر اساس نتایج حاصل از آزمون سنجش بافت، توان ۱۰۰ و ۱۵۰ و زمان به ترتیب ۲۴۰ و ۱۲۰ ثانیه، به‌عنوان مناسب‌ترین شرایط جهت ایجاد ژل از هیدروکلوئید ژلاتین در دمای پائین انتخاب گردید. ژل‌های تولیدشده با این روش از نظر استحکام بافت قابل مقایسه با ژل‌های حرارتی می‌باشد [۷۷].

عزیزی و همکاران (۲۰۱۲) به بررسی تأثیر اعمال امواج فراصوت بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی و رئولوژیکی محلول‌ها و ژل‌های کاراگینان و ژلاتین پرداختند. به این منظور تشکیل ژل از کاراگینان و ژلاتین توسط تیمار فراصوت، از دستگاهی با فرکانس ۲۰ کیلوهرتز، دامنه ۱۰۰٪ و با توان ۵۰-۱۵۰ وات استفاده شد. دیسپرسیون‌های کاپاکاراگینان در غلظت ۰.۴٪ در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد و دیسپرسیون‌های ژلاتین در غلظت ۰.۴٪ در دمای ۱۳ درجه سانتی‌گراد، برای مدت زمان‌های مختلف تحت تیمار با فراصوت قرار گرفتند. در اثر اعمال فرآیند فراصوت، میزان جذب آب و حلالیت در آب هر دو نمونه هیدروکلوئید افزایش یافت. افزایش مدت زمان و توان اعمال فراصوت بعد از یک سطح معین (معمولاً ۳ دقیقه) باعث کاهش پارامترهای بافتی ژل کاراگینان شد [۷۸].

مکلمنتر و لی (۲۰۱۰) در مقایسه روش اولتراسونیک با هم زدن مکانیکی برای دستیابی به اندازه کوچک‌تر ذرات، به این نتیجه رسیدند که در روش اولتراسونیک میزان مصرف انرژی کاهش یافته و نانوذلهای حاصل پایداری بیشتری دارند. اندازه ذرات تولیدشده از طریق برهم‌کنش متقابل بین شکستن ذرات و آمیختگی آن‌ها کنترل می‌گردد [۷۹].

جعفری و همکاران (۲۰۰۷) در مطالعه‌ای بازده دو روش اولتراسوند و میکروفلودایزر در تولید نانوامولسیون از روغن ماهی را مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها گزارش کردند هر دو روش می‌تواند ذراتی با محدوده قطر ۷۰۰-۱۵۰ نانومتر تولید کند، اما با استفاده از میکروفلودایزر، نانوامولسیون‌های با توزیع اندازه ذرات محدود حاصل گردید [۸۰].

جنا و داس (۲۰۰۶) تأثیر نوع و غلظت امولسیفایر و مدت زمان استفاده از امواج فراصوت را بر توزیع ذرات امولسیون شیر نارگیل، مورد بررسی قرار دادند. نتایج تحقیقات آن‌ها نشان داد هر سیستم امولسیون به غلظت بهینه‌ای از امولسیفایر نیاز دارد و افزایش بیش از اندازه آن باعث رشد اندازه قطرات و کاهش پایداری امولسیون می‌شود [۸۱].

فصل سوم: مواد و روش‌ها

در این فصل مواد به کاررفته، روش تولید و بهینه‌سازی فرمولاسیون نانو ژل ایزوله پروتئین سویا، روش‌های انجام آنالیزهای مربوطه به منظور تعیین خواص ژل تشکیل شده و راندمان درون پوشانی و رهایش کنترل شده آهن در شرایط شبیه‌سازی شده معده و روده شرح داده شده است.

۳-۱- مواد مورد استفاده جهت تهیه نانو ژل ایزوله پروتئین سویا

ایزوله پروتئین سویا ۹۰٪ (شرکت جی مکس، چین)

کلرید کلسیم (شرکت مرک، آلمان)

سولفات آهن (شرکت سیگما، آمریکا)

هیدروکسیل آمین هیدروکلراید (شرکت مرک، آلمان)

ارتوفنانترولین (شرکت مرک، آلمان)

کلرید سدیم (شرکت مرک، آلمان)

کلرید پتاسیم (شرکت مرک، آلمان)

دی سدیم هیدروژن فسفات (شرکت مرک، آلمان)

پتاسیم دی هیدروژن فسفات (شرکت مرک، آلمان)

پپسین (فعالیت ۱۸۰۰-۶۰۰ واحد/ میلی گرم پروتئین از موکوس معده خوک) از شرکت سیگما آمریکا

پانکراتین 3X (از پانکراس خوک) شرکت سیگما آمریکا

۲-۳- تجهیزات و لوازم آزمایشگاهی

جهت انجام آزمایش‌های مربوطه از لوازم و دستگاه‌های زیر استفاده شد:

همزن مغناطیسی مدل LABINCO L-80، هلند

ترازوی دیجیتالی مدل AS 220/C/1 با دقت ۰.۰۰۰۱ گرم، RADWAG لهستان

ترازوی دیجیتالی مدل GE 412 با دقت ۰.۰۱ گرم، Sartorius آلمان

دستگاه اندازه‌گیری اندازه ذرات مدل SALD 2101، ژاپن

دستگاه اولتراسوند مدل LS 7، BANDELIN آلمان

سانتریفوژ یخچال دار مدل SW14R، Froilabo فرانسه

pH متر مدل STARTER 3000، شرکت اهاوس آمریکا

بافت سنج مدل TA-TX2، شرکت stable Micro Systems انگلستان Texture Profile analyzer

اسپکتروفتومتر مدل UNICO UV-2100، آمریکا

دوربین دیجیتال ۱۴ مگا پیکسل، شرکت canon مدل Power Shot SX270HS ساخت مالزی و نرم‌افزار

گرافیکی فتوشاپ CS5

انکوباتور شرکت Persian Teb، ساخت ایران

اتوکلاو مدل RT-2 ریحان طب، ایران

آون بهداد ایران

شیکر اینکوباتور با حمام آب مدل G76، شرکت New Brun Swick آمریکا

سمپلر در اندازه‌های مختلف ۱۰-۱۰۰۰ میکرولیتر

سرنگ همیلتون

فیلترهای آمیکون

۳-۳- روش‌های مورد استفاده

۳-۳-۱- تهیه نانو ژل ایزوله پروتئین سویا حاوی سولفات آهن

به منظور تهیه ژل از روش مالتیس و همکاران استفاده شد، به این صورت که ابتدا ایزوله پروتئین سویا (۹٪ وزنی/وزنی) به آب مقطر اضافه شده و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی گراد) روی همزن مغناطیسی تحت هم زدن مداوم قرار گرفت تا پروتئین کاملاً هیدراته شود. به منظور یافتن شرایط بهینه تولید ژل، محلول حاصل در دماهای ۸۰-۹۰-۱۰۰-۱۲۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰-۶۰-۱۲۰-۱۸۰ دقیقه حرارت داده شد و پس از آن، نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت تا خنک شوند. جهت تشکیل ژل، کلرید کلسیم در غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میلی مولار به منظور بررسی تأثیر آن در تولید ژل به نمونه اضافه گردید. بلافاصله پس از افزودن کلرید کلسیم، سولفات آهن در غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی مولار به محلول اضافه و جهت حل شدن کامل به مدت ۱۵ دقیقه روی همزن مغناطیسی تحت هم زدن قرار گرفتند.

سپس نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری شد [۶۹] و نهایتاً جهت تشکیل نانوژل ایزوله پروتئین سویا، نمونه‌ها تحت تأثیر امواج اولتراسوند با توان ۹۰ وات و دامنه ۷۵٪ و فرکانس ۲۰ کیلوهرتز به مدت ۵ دقیقه قرار گرفتند [۷۵]. در شکل (۱-۳) دستگاه اولتراسوند مورد استفاده در این تحقیق نشان داده شده است.



شکل (۱-۳): دستگاه اولتراسوند مدل LS 7 BANDELIN آلمان

۳-۲-۳- بازدهی درون پوشانی

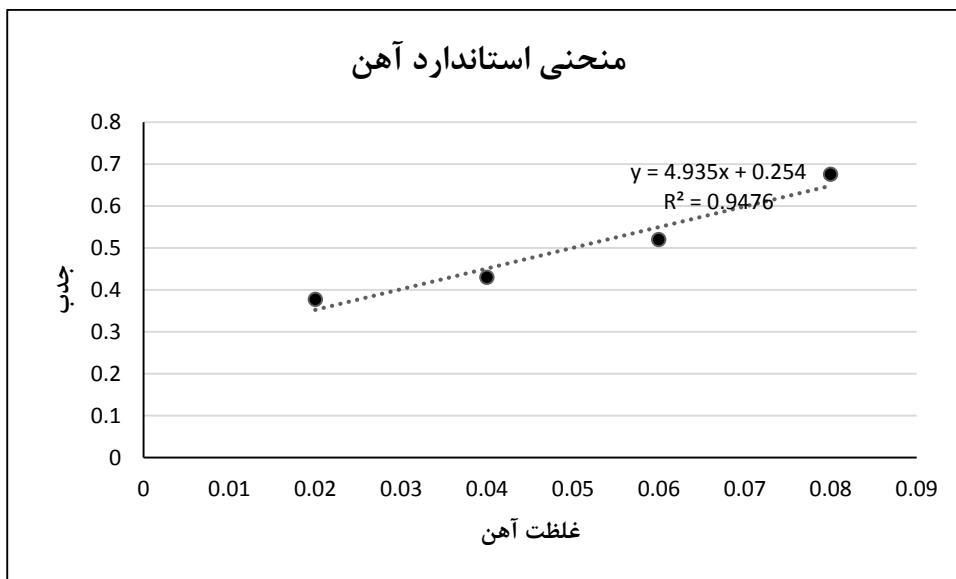
برای تخمین بازده درون پوشانی لیگاند (آهن) درون نانوژل، لیگاندهای درون پوشانی نشده به وسیله اولترافیلتراسیون با استفاده از فیلتر آمیکون جداسازی شدند. برای این منظور ۴ ml از نمونه نانوژل حاوی لیگاند به درون فیلتر آمیکون انتقال یافته و از طریق سانتریفیوژ شدن با دور ۴۵۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد لیگاندهای آزاد جدا شدند. میزان دقیق پرمیت حاصل از طریق سمپلر و سرنگ همیلتون مشخص شد و سپس ۰/۱ ml از آن با ۱/۹ ml آب مقطر رقیق و به آن ۰/۲ ml هیدروکسیل آمین هیدروکلراید ۱۰٪ و ۰/۲ ml ارتوفنانترویلین ۳٪ افزوده شد. سپس لیگاندهای آزاد درون پرمیت با

استفاده از اسپکتروفتومتر مرئی- ماورابنفش مدل UNICO UV-2100، آمریکا (شکل ۳-۲) در طول موج ۵۱۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. غلظت لیگاندهای آزاد بر اساس منحنی استاندارد (شکل ۳-۳) که با استفاده از محلول‌های استاندارد لیگاند به دست آمده بود، محاسبه شد [۹].



شکل (۳-۲): دستگاه اسپکتروفتومتر مدل UNICO UV-2100، آمریکا

جهت رسم منحنی استاندارد، محلول مادر 0.01 g/ml سولفات آهن تهیه شد و سپس ۵ محلول با غلظت-های مختلف 0.02 mg/ml تا 0.1 mg/ml سولفات آهن از محلول مادر تهیه شد و به آن‌ها 0.1 ml هیدروکسیل آمین هیدروکلرید 10% و 0.1 ml ارتوفنانترولین 3% افزوده شد. محلول را روی همزن مغناطیسی به مدت ۱۰ دقیقه هم زده و سپس جذب آن‌ها در طول موج بیشترین جذب یعنی 510 nm نانومتر ثبت شد. حلال به کاررفته در این بررسی آب مقطر می‌باشد.



شکل (۳-۳): منحنی استاندارد آهن

۳-۳-۳- بررسی رهائش آهن درون پوشانی شده در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش

بررسی پروفایل رهائش آهن از درون نانوزل‌ها با استفاده از فیلتر آمیکون انجام شد. جهت شبیه‌سازی معده یک حجم از نمونه نانوزل با یک حجم اسید هیدروکلرید-پپسین ۱ wt% (شیره معده) با pH=۴ مخلوط شد و برای حفاظت از آن در برابر نور فویل آلومینیومی دور مخلوط پیچیده شد و به مدت ۶ ساعت در شیکر اینکوباتور با حمام آب مدل G76، شرکت New Brun Swick آمریکا در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به آرامی با دور ۱۰۰ rpm هم زده شد و در این مدت به فاصله‌های زمانی یک‌ساعته از آن نمونه‌برداری شد. سپس در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دور حدود ۴۵۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانترفیوژ شد. علت سانترفیوژ کردن در این دما توقف فعالیت‌های آنزیمی است. برای شبیه‌سازی روده هم مانند معده عمل شد، با این تفاوت که یک حجم از نمونه با یک حجم فسفات بافر سیلین ۱۰ mM پانکراتین ۱ wt% با pH=۷/۴ مخلوط شد و به مدت ۶ ساعت در شرایطی مشابه با آنچه ذکر شد قرار گرفت و به فاصله‌های زمانی ۱ ساعته از آن نمونه‌برداری شد. تمامی نمونه‌ها در برابر نور محافظت شده و محتوای لیگاند رهائشده در پرمیت با

استفاده از اسپکتروفتومتر مرئی- ماورا بنفش UNICO UV-2100 در طول موج ۵۱۰ نانومتر اندازه‌گیری شد [۶۶].

۳-۳-۴- اندازه‌گیری خواص رنگی

به‌منظور ارزیابی رنگ و تعیین فاکتورهای رنگ سنجی (L, a, b) از دوربین دیجیتال ۱۴ مگا پیکسل مدل Power Shot SX270HS ساخت مالزی و برنامه فتوشاپ CS5 استفاده شد. میزان زردی و آبی بودن را با مؤلفه b بیان نموده، به‌گونه‌ای که +b زرد بودن و -b آبی بودن را نشان می‌دهد. سبزی و قرمزی را نیز با مؤلفه a نشان می‌دهند، به‌گونه‌ای که مقادیر +a قرمز بودن و -a سبز بودن را نشان می‌دهد. به‌علاوه مؤلفه L در این سیستم رنگ سنجی میزان روشنایی را نشان می‌دهد، به‌گونه‌ای که برای رنگ سفید مقدار L برابر ۱۰۰ و برای رنگ سیاه صفر در نظر گرفته می‌شود. شرایط عکس‌برداری برای تمام نمونه‌ها یکسان و در داخل یک محفظه چوبی غیر قابل نفوذ به نور با زمینه‌ای به رنگ سفید انجام گرفت. جهت نورپردازی فضا از لامپ فلورئوسنت استفاده گردید. زاویه بین عدسی دوربین و منبع نوری حدود ۴۵ درجه بود تا نور منعکس شده به دوربین از منبع نوری نبوده و از نمونه‌ها باشد. فاصله نمونه‌ها از دوربین ۳۰ سانتی‌متر در نظر گرفته شد. علاوه بر این، برای یکنواخت بودن شدت منبع نور، لامپ نیم ساعت قبل از شروع کار روشن گذاشته می‌شد. پس از عکس‌برداری توسط دوربین دیجیتال، عکس‌ها توسط نرم‌افزار فتوشاپ مورد بررسی قرار گرفت و از مرکز هر نمونه یک مساحت ثابت انتخاب گردید و فاکتورهای L, a و b برای هر مساحت اندازه‌گیری شد [۸۲].

۳-۳-۵- اندازه‌گیری اندازه ذرات تولیدشده

توزیع اندازه ذرات و قطر متوسط آن‌ها در دستگاه سنجش اندازه ذرات با محدوده اندازه ذرات ۱۰ نانومتر تا ۶۰ میکرومتر (SHIMADZO مدل SALD 2101 ساخت ژاپن) در آزمایشگاه صنعتی دانشکده داروسازی

دانشگاه علوم پزشکی شیراز بر اساس روش پراش استاتیک پرتو لیزر (روش SLS¹) اندازه‌گیری شدند. سل حاوی آب دو بار تقطیر شده به‌عنوان مرجع قرار گرفت و پیک‌های مربوط به آب، در اندازه‌گیری حذف شد. در مرحله بعد، آب دو بار تقطیر با استفاده از سرنگ، از محفظه سل تخلیه شد و محلول موردنظر برای آنالیز در آن قرار گرفت. (شکل ۳-۴). باید توجه کرد در این مرحله درب دستگاه حتماً باید بسته شود تا نور لیزر به نمونه تابانده شود. متوسط اندازه ذرات بر اساس میانگین قطر حجمی تعیین شد و کلیه نمونه‌ها در سه تکرار اندازه‌گیری شدند.

میانگین قطر حجمی (میانگین حجم معادل) یا DeBroukere mean:

$$\bar{D}[r, v] = \frac{\sum n_i d_i^r}{\sum n_i d_i^v} \quad \text{معادله (۱-۳)}$$

توزیع اندازه ذرات با محاسبه شاخص پراکنش ذرات (span) محاسبه شد:

$$\text{Span} = \frac{D(90\%) - D(10\%)}{D(50\%)} \quad \text{معادله (۲-۳)}$$

D (90%): قطری که حجم ذرات کوچک‌تر از آن، ۹۰٪ حجم کل ذرات سیستم را تشکیل می‌دهد.

D (50%): قطری که حجم ذرات کوچک‌تر از آن، ۵۰٪ حجم کل ذرات را تشکیل می‌دهد (قطر میانه).

D (10%): قطری که حجم ذرات کوچک‌تر از آن، ۱۰٪ حجم کل ذرات سیستم را تشکیل می‌دهد.

میزان اسپن کمتر، نشان‌دهنده توزیع در اندازه ذرات باریک‌تر است. کلیه اندازه‌گیری‌ها پس از گذشت ۲۴ ساعت از تولید نمونه و نگهداری آن در دمای اتاق انجام شد [۸۳].

¹ Static Light Scattering



شکل (۳-۴): دستگاه اندازه‌گیری اندازه ذرات مدل Sald 2101.

۳-۳-۶- آنالیز پروفیل بافت ژل

از آنجاکه بافت مواد غذایی بر پذیرش مصرف‌کننده تأثیرگذار است معیار مهمی از کیفیت محسوب می‌شود [۸۴]. اصطلاح بافت مواد غذایی به گروهی از خصوصیات فیزیکی مواد غذایی اطلاق می‌شود که به وسیله لمس کردن که عموماً از طریق کام و زبان صورت می‌گیرد، احساس و درک می‌شود [۸۵]. از میان خواص مکانیکی مختلف مواد غذایی سفتی، پیوستگی و چسبندگی به‌عنوان پارامترهای اولیه و قابلیت جویدن و صمغی بودن بافت، به‌عنوان پارامترهای ثانویه شناخته می‌شوند [۸۶].

بافت نانوزل‌های ایزوله پروتئین سویا حاوی درصد‌های مختلف آهن و کلرید کلسیم، با استفاده از دستگاه بافت سنج مدل TA-TX2، شرکت stable Micro Systems انگلستان و از طریق آزمون^۱ TPA ارزیابی شد. به این منظور ژل‌های پروتئینی مطابق روش گفته شده در بخش ۳-۳-۱ در حجم ۵۰ گرم آماده گردید. تست کمپرس^۲ دومرحله‌ای ژل با استفاده از پروب استوانه‌ای از جنس استیل ضدزنگ با قطر ۴۰ میلی‌متر که در شکل ۳-۵ نشان داده شده است و مطابق برنامه تنظیم شده در جدول ۳-۱ انجام گرفت و پارامترهایی

¹ Texture Profile Analysis

² Compression

مثل سفتی^۱ (حداکثر نیرو در واحد سطح)، خاصیت صمغی^۲ (حاصل ضرب بیشینه نیرو در میزان به هم-پیوستگی)، قابلیت جویدن^۳ (حاصل ضرب میزان ارتجاع پذیری در صمغی بودن)، پیوستگی^۴ (حاصل تقسیم سطح ۲ به ۱) و قابلیت ارتجاع^۵ (بازگشت نمونه بعد از کمپرس کردن به حالت اولیه) از منحنی TPA به دست آمده اندازه گیری شد. برای هر نمونه تمام اندازه گیری ها در دمای محیط در ۳ تکرار انجام شد [۸۷].

جدول (۱-۳): برنامه داده شده به دستگاه بافت سنج به منظور بررسی قدرت ژل

فشردگی	حالت آزمون
۵ میلی متر/ثانیه	حالت قبل از آزمون
۰/۲۵ میلی متر/ثانیه	سرعت آزمون
۵ میلی متر/ثانیه	سرعت پس از آزمون
کرنش	حالت هدف
۱۰ ثانیه	زمان
٪۲۵	کرنش
اتوماتیک(نیرو)	نوع محرک
۶ گرم	نیروی محرک
خاموش	حالت استراحت
بعد از تنظیم مجدد	متوقف شدن در

¹ Firmness

² Guminess

³ Chewiness

⁴ Cohesiveness

⁵ Springiness



شکل (۳-۵): دستگاه بافت سنج TA-TX2، شرکت stable Micro Systems انگلستان

۳-۴- آنالیز آماری

نوع آزمایش طرح کاملاً تصادفی بود. تمام آزمایشات در سه تکرار انجام شد. آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون چند دامنه دانکن برای مقایسه اختلافها در سطح ۵ درصد با نرم افزار SPSS 16.0 محاسبه گردید. میانگین، انحراف استاندارد (SD) و رسم نمودارها با استفاده از نرم افزار میکروسافت اکسل ۲۰۱۰ انجام شد.

فصل چہارم: نتیجہ و بحث

در این تحقیق، محلول‌هایی از ایزوله پروتئین سویا تهیه شد، سپس به‌منظور یافتن شرایط بهینه تولید ژل به روش ژله‌ای شدن سرد، محلول در شرایط دمایی و زمانی مختلف حرارت داده شد و جهت تشکیل ژل از غلظت‌های مختلف کلرید کلسیم استفاده گردید. پس از یافتن شرایط بهینه تولید، ژل حاصله توسط به-کارگیری امواج فراصوت به نانوژل ایزوله پروتئین سویا جهت درون‌پوشانی آهن تبدیل گردید. در زیر نتایج به‌دست‌آمده ارائه گردیده است.

۴-۱-۴-شرایط بهینه تشکیل ژل

۴-۱-۱-۴-شرایط بهینه دمای حرارت دهی جهت تشکیل ژل

واضح است که دمای حرارت دهی روی ساختار ژل اثرگذار بوده و پیش‌نیاز تشکیل ژل می‌باشد. در این تحقیق نتایج نشان داد که با افزایش دمای حرارت دهی استحکام ژل افزایش و بافت آن بهبود یافت و هم‌چنین آب اندازی ژل تشکیل‌شده کمتر شد، طوری که ژلهایی که در دمای کمتر از ۱۰۰ درجه سانتی-گراد حرارت داده شدند از لحاظ ظاهری استحکام کمتر و بافت ضعیف‌تری نسبت به ژلهای حرارت دیده در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد داشتند که دلیل آن را می‌توان به دناتوره شدن ناقص پروتئین‌های سویا در شرایط حرارت دهی در دمای پائین نسبت داد. در دماهای کمتر از ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد احتمالاً بخش ۱۱S پروتئین سویا به‌صورت دناتوره نشده باقی مانده و تنها قسمتی از بخش ۷S آن دناتوره می‌گردد؛ بنابراین در این دما فقط بخش ۷S چارچوب ژل را تشکیل می‌دهد؛ اما زمانی که نمونه‌ها در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شدند، تمام بخش ۷S و قسمتی از ۱۱S پروتئین سویا دناتوره گردید و هر دوی آنها به شکل مشترک در تشکیل ژل نقش داشتند [۸۸]. در pH و غلظت یکسان پروتئین، ژلهای حاصل از دناتوره شدن بخش ۱۱S پروتئینی، استحکام بیشتر و بافت بهتری نسبت به ژلهای حاصل از دناتوره شدن بخش ۷S داشتند و این ژل‌ها در فشار و استرس بالاتری شکسته می‌شدند که دلیل استحکام بیشتر ژلهای تشکیل شده در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد نسبت به ۸۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. با افزایش دمای حرارت دهی به

۱۲۰ درجه سانتی‌گراد پروتئین‌ها به‌طور کامل دناتوره شده و به همین علت ژل ساختار مناسب‌تری به‌دست آورد. از طرف دیگر با افزایش دمای حرارت دهی پلی‌پپتیدهای بیشتری در تشکیل ژل مشارکت داشتند. در اثر حرارت دهی در دماهای کمتر از ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد ژل ایجاد شده به روش ژله‌ای شدن سرد دارای اتصالات ضعیفی بود، درحالی‌که حرارت دهی در دمای بالا خصوصاً در ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد با تشکیل پروتئین‌های تجمع یافته با وزن مولکولی پائین و آب‌گریزی سطحی کمتر، بافت ژل از لحاظ ظاهری بهبود یافت [۸۹].

زین لو و همکاران در سال ۲۰۱۰ دمای بهینه جهت تشکیل ژل ایزوله پروتئین سویا به روش ژله‌ای شدن سرد را دماهای بالاتر از ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد گزارش نمودند و دلیل آن را ایجاد پیوندهای ضعیف بین پروتئین‌ها و نهایتاً ایجاد ژل ضعیف در دماهای پائین بیان کردند. همچنین نتایج آن‌ها نشان داد که در اثر حرارت دهی در دمای ۸۰ و ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد، ژل حاصل ساختار خوشه‌ای داشت و اندازه پروتئین‌های تجمع یافته در ۸۰ درجه سانتی‌گراد ناهمگن‌تر از ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد بود، اما در اثر حرارت دهی در ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد ساختار رشته‌ای مانند در ژل ایجاد گردید که بافت مناسب‌تر و استحکام بیشتری داشت [۴۹].

طبق مشاهدات مالتیس و همکاران در سال ۲۰۰۸، نمونه‌های حرارت دیده در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد ژلهایی با ذرات ناهمگن تشکیل دادند و با افزایش دما ژل ساختار مناسب‌تر و بهتری داشت [۸۷]

۴-۱-۲- شرایط بهینه زمان حرارت دهی جهت تشکیل ژل

در بررسی تأثیر زمان حرارت دهی مشاهده شد که افزایش زمان، روی استحکام و بافت ژل تأثیر قابل‌توجهی نداشت، زیرا در روش تشکیل ژل به روش ژله‌ای شدن سرد، دناتوره شدن و تجمع ذرات پروتئینی از مرحله تشکیل ژل جدا می‌باشد و بعد از حرارت دهی و خنک نمودن محلول پروتئینی، تشکیل ژل از طریق افزودن

نمک یا اسید در دمای محیط (۲۵ درجه سانتی‌گراد) صورت می‌پذیرد [۵۶]. بنابراین تأثیر زمان حرارت دهی روی خصوصیات ژل تشکیل شده محدود بود.

نتایج زین لو و همکاران در سال ۲۰۱۰ نتایج فوق را تأیید کرد. طبق مشاهدات آن‌ها افزایش زمان حرارت دهی شفافیت ژل را افزایش داد اما تأثیری روی بافت ژل، مدول یانگ^۱، تنش برشی و توانایی نگهداری آب در ژل نداشت [۴۹].

هانگ و همکاران نیز در سال ۱۹۹۹ نشان دادند که افزایش زمان حرارت دادن در ژل‌های حاصل از ایزوله پروتئین آب پنیر، تأثیر قابل توجهی روی مدول یانگ، تنش برشی، توانایی نگهداری آب و قابلیت کشش ژل ندارد [۶۱].

۴-۱-۳- غلظت بهینه کلرید کلسیم جهت تشکیل ژل

غلظت کلرید کلسیم تأثیر به‌سزایی روی استحکام و بافت ژل داشت. با افزایش غلظت کلرید کلسیم از ۱۰ به ۲۰ میلی‌مولار، استحکام و بافت ژل بهبود یافت، زیرا یون‌های کلسیم دافعه الکترواستاتیک را خنثی کرده و پل‌های نمکی بین پروتئین‌های تجمع یافته ایجاد می‌نمود که منجر به تشکیل شبکه سه‌بعدی پایدار شده توسط نیروهای واندروالسی یا هیدروفوبی می‌گردید [۵۶]. با افزایش یون‌های کلسیم به ۲۰ میلی‌مولار تعداد پل‌های نمکی افزایش یافته و اثر خنثی‌سازی دافعه الکترواستاتیک بهبود یافت و در نتیجه استحکام ژل بیشتر شد؛ اما زمانی که غلظت یون‌های کلسیم از ۲۰ میلی‌مولار بیشتر شد بافت و استحکام ژل کاهش یافت زیرا با افزایش غلظت یون‌های کلسیم، سرعت تشکیل ژل افزایش یافت که منجر به ایجاد ساختار خوشه‌ای مانند و کاهش ظرفیت نگهداری آب در ژل گردید. در غلظت بسیار بالای کلسیم نیز پیوندهای بین پروتئین‌ها نامنظم شده و حفره‌های ناهمگنی ایجاد گردید که منجر به بافت نامناسب و کاهش استحکام ژل شد.

¹ Young's Modulus

نتایج حاصل از تحقیقات زین لو و همکاران در سال ۲۰۱۱ نتایج فوق را تأیید نمود. طبق مشاهدات آن‌ها با افزایش غلظت کلرید کلسیم به ۳۰ میلی‌مولار ساختار ژل خوشه‌ای و اندازه تخلخل ژل افزایش یافت [۴۹]. هانگ و همکاران نیز در سال ۱۹۹۹ نشان دادند افزایش غلظت کلرید کلسیم منجر به ایجاد اتصالات عرضی بیشتری بین پروتئین‌ها می‌شود. در غلظت‌های کمتر از ۳۰-۴۰ میلی‌مولار کلرید کلسیم، پراکندگی بار منجر به افزایش سرعت تجمع می‌شود، در حالی که در غلظت‌های بالاتر از ۳۰-۴۰ میلی‌مولار منجر به کاهش سرعت تجمع می‌گردد [۶۱].

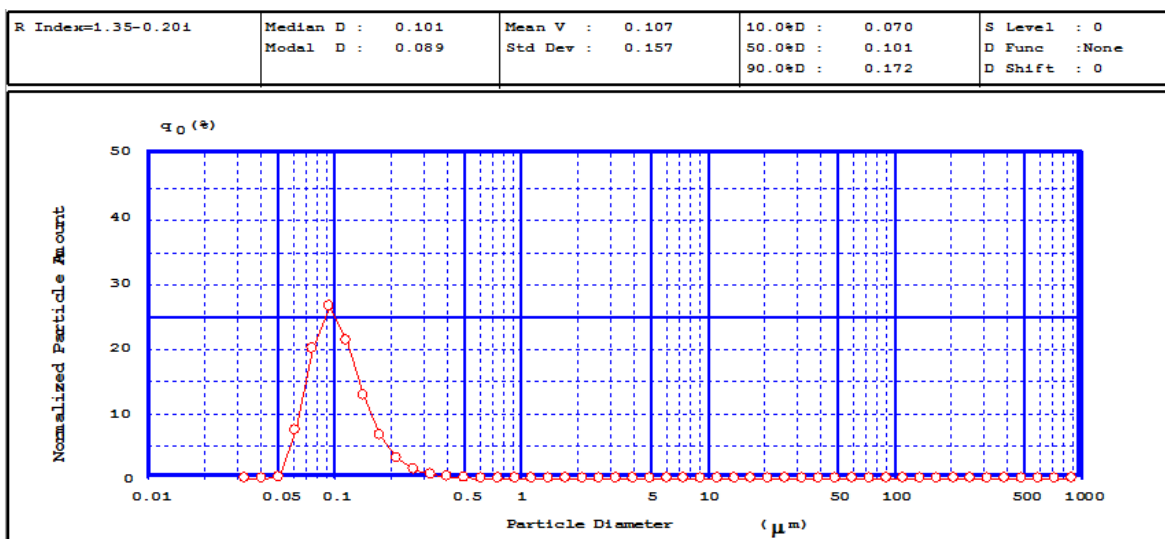
در آزمایش مالتیس و همکاران در سال ۲۰۰۵ با افزایش غلظت کلرید کلسیم از ۱۰ به ۲۰ میلی‌مولار به دلیل ایجاد اتصالات بین پروتئین و کلرید کلسیم بافت ژل بهبود یافت [۹۰].

۴-۲- اندازه ذرات

اندازه ذرات و توزیع آن‌ها، نقش مهمی در ویژگی‌های فیزیکی ژل‌ها مانند پایداری، کدورت و ویژگی‌های رئولوژیکی دارد. هم‌چنین بر ویژگی‌هایی مانند دسترسی زیستی و خواص ارگانولپتیکی فرآورده غذایی مؤثر است. کاهش اندازه ذرات به مقیاس نانومتری، موجب افزایش نسبت سطح به حجم ذرات شده و به این طریق بر ویژگی‌های فیزیکی، زیستی و حسی سیستم تأثیر می‌گذارد و موجب افزایش ویژگی‌های مطلوبی نظیر پایداری، شفافیت و کارایی درون پوشانی سیستم می‌شود [۳۲]. طبق نتایج حاصل از جدول ۴-۱ و شکل ۴-۱ مربوط به اندازه‌گیری قطر متوسط اندازه ذرات در غلظت‌های مختلف آهن مشاهده شد که متوسط قطر حجمی و توزیع اندازه ذرات (اسپن) به ترتیب در محدوده ۱۰۷ نانومتر و ۱ قرار داشتند. هم‌چنین اثر غلظت‌های مختلف آهن بر اندازه ذرات در سطح ۵٪ معنی‌دار نبود. در نتیجه می‌توان بیان کرد که تغییر در غلظت آهن در دامنه ۵-۱۵ میلی‌مولار از طریق به‌کارگیری امواج فراصوت با توان ۹۰ وات و دامنه ۷۵٪ و فرکانس ۲۰ کیلوهرتز به مدت ۵ دقیقه تفاوتی در اندازه ذرات نانوذله ایزوله پروتئین سویا ایجاد نمی‌کند.

جدول (۴-۱): اندازه ذرات نانوذله

اندازه ذرات	نمونه
۱۰۷ nm	غلظت ۵ میلی مولار آهن
۱۰۷ nm	غلظت ۱۰ میلی مولار آهن
۱۰۷ nm	غلظت ۱۵ میلی مولار آهن



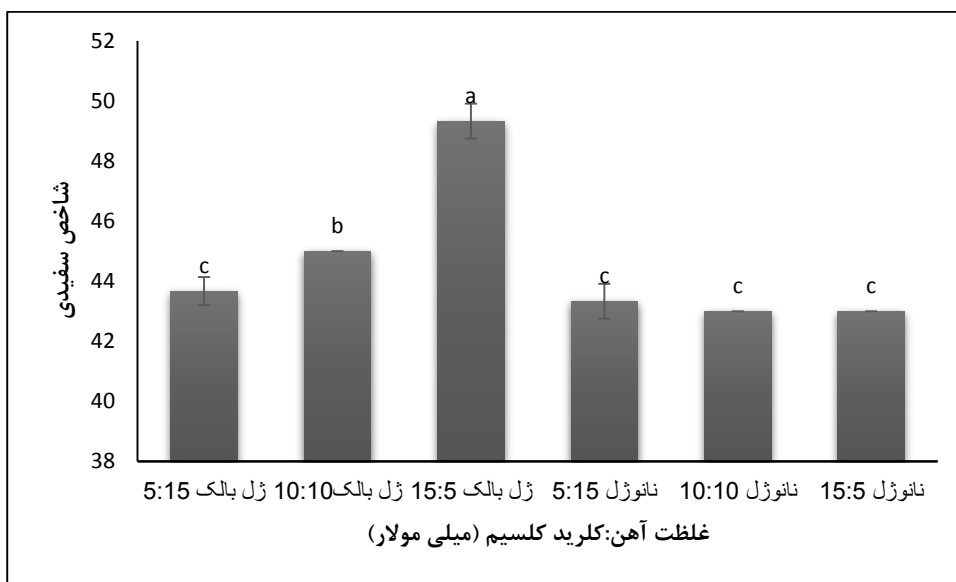
شکل (۴-۱): نتایج حاصل از آزمون اندازه ذرات با استفاده از SLS

۴-۳- ارزیابی رنگ ژل ایزوله پروتئین سویا و نانوذله های آن

در مطالعات رنگ سنجی انجام شده روی ژل و نانوذله پروتئین سویا سه پارامتر L ، a و b که به ترتیب نشان دهنده میزان روشنایی، قرمزی-سبزی و زردی-آبی نمونه‌هاست اندازه‌گیری شد. شکل‌های ۴-۲ و ۴-۳ و ۴-۴ نتایج به دست آمده از رنگ سنجی نمونه‌های ژل و نانوذله پروتئین سویا را نشان می‌دهند. سفیدی ژل به اندازه ذرات بستگی دارد و فاکتور L نشانگر تجمع ذرات پروتئینی در طول تشکیل ژل می‌باشد. در ژل‌های کدر فاکتور L افزایش می‌یابد، زیرا تجمع‌های بزرگ‌تر پروتئینی نور بیشتری پراکنده می‌کنند.

در مورد شاخص سفیدی چنانچه در شکل ۴-۲ مشخص است با افزایش غلظت آهن شاخص سفیدی افزایش یافته است، زیرا در غلظت‌های بالاتر آهن اندازه پروتئین‌های تجمع یافته در شبکه ژل بزرگ‌تر شده که منجر به پراکندگی بیشتر نور و تولید ژل‌های سفیدتر می‌گردد.

از طرف دیگر اندیس سفیدی نانوژل‌ها کمتر از ژل‌های ایزوله پروتئین سویا بود. به‌طور کلی امواج فراصوت به کمک تأثیرات ناشی از پدیده کاویتاسیون، با اعمال دما و فشار برش موضعی باعث آسیب رساندن به ساختار گرانول‌ها، تخریب برخی پیوندهای کووالانسی و نهایتاً شکسته شدن و کوچک‌تر شدن ذرات می‌شد.

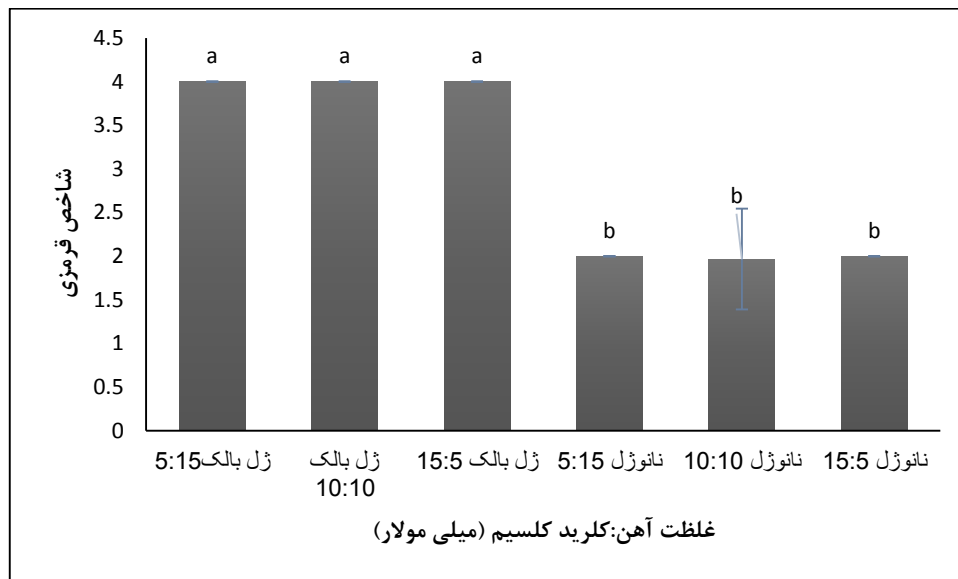


شکل (۴-۲): تأثیر مقادیر مختلف آهن بر شاخص سفیدی ژل ایزوله پروتئین سویا و نانوژل آن

باربوت و همکاران در سال ۱۹۹۷ نشان دادند با افزایش غلظت کلرید سدیم فاکتور L افزایش می‌یابد و ژل سفیدتری تولید می‌گردد؛ زیرا افزایش غلظت نمک کلرید سدیم منجر به افزایش اندازه تجمع ذرات می‌گردد [۶۳].

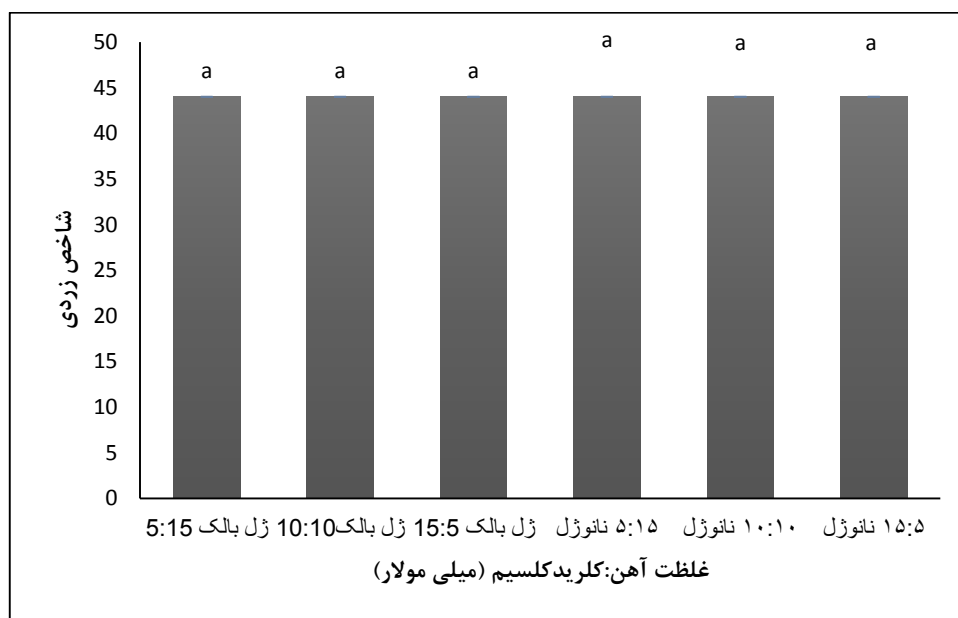
مالتیس و همکاران نیز در سال ۲۰۰۵ نشان دادند با افزایش غلظت کلرید کلسیم از ۱۰ به ۲۰ میلی‌مولار به دلیل افزایش اندازه تجمع ذرات پروتئینی کدورت ژل افزایش می‌یابد [۹۰].

در مورد شاخص قرمزی همان‌طور که در شکل ۳-۴ مشاهده می‌شود، فاکتور شاخص قرمزی در اثر به-کارگیری امواج فراصوت کاهش یافت که می‌تواند به دلیل کاهش اندازه ذرات باشد.



شکل (۳-۴): تأثیر استفاده از امواج فراصوت بر شاخص قرمزی

در رابطه با شاخص زردی همان‌گونه که در شکل ۴-۴ مشاهده می‌شود به دلیل عدم تاثیر اندازه ذرات و غلظت کلرید کلسیم و آهن روی این شاخص، تفاوت معنی‌داری بین نمونه‌های مختلف وجود نداشت.



شکل (۴-۴): تأثیر مقادیر مختلف آهن بر شاخص زردی ژل ایزوله پروتئین سویا و نانوژل آن

۴-۴- کارایی انکپسولاسیون

در این پژوهش غلظت‌های مختلف آهن در ایزوله پروتئین سویا درون پوشانی شد و درصد آهن به دام افتاده پس از جداسازی بخش به دام افتاده و رها با استفاده از اسپکتروفتومتر مرئی-ماورابنفش در طول موج ۵۱۰ نانومتر و با استفاده از منحنی استاندارد (شکل ۳-۳) تخمین زده شد. کارایی کپسولاسیون نانوزل‌ها در غلظت‌های مختلف آهن در جدول ۴-۲ نشان داده شده است. با توجه به نتایج، بالاترین مقدار کپسولاسیون برای نمونه دارای غلظت ۱۵ میلی‌مولار آهن مشاهده شد و همچنین کارایی کپسولاسیون با کاهش غلظت آهن، کاهش یافت زیرا توانایی اتصال و ایجاد پیوند بین آهن و پروتئین‌ها به‌طور قابل توجهی با افزایش نسبت جرمی بین ایزوله پروتئین سویا و آهن افزایش یافت. غلظت بالاتر آهن در رتنتیت نسبت به پرمیت گواهی بر تمایل بیشتر آهن به نانوزل نسبت به سرم اطراف بود.

سوجی آرتو و همکاران در سال ۲۰۰۹ بیان نمودند درون پوشانی آهن درون ژل پروتئین کازئین تشکیل شده به روش ژله‌ای شدن سرد با افزایش غلظت آهن از ۰ به ۴ میلی‌مولار افزایش یافته و به ۹۰٪ می‌رسد [۹۱].

مالتیس و همکاران در سال ۲۰۰۹ از ژله‌های ایزوله پروتئین سویای تشکیل شده به روش ژله‌ای شدن سرد جهت درون پوشانی ریبوفلاوین استفاده کردند و بیان نمودند که پروتئین‌های سویا جهت درون پوشانی مواد زیست فعال مناسب می‌باشند [۶۹].

ردی و همکاران در سال ۱۹۹۱ از فرآیند اسیدی کردن جهت تشکیل ژل کازئین به روش ژله‌ای شدن سرد و درون پوشانی آهن در آن استفاده نمودند و کارایی درون پوشانی را ۹۵٪ گزارش نمودند [۹۲].

جدول (۴-۲): کارایی درون پوشانی در غلظت‌های مختلف آهن در سه بار تکرار

نمونه	بازدهی درون پوشانی (%)
غلظت ۵ میلی مولار آهن	۷۸±۰/۳
غلظت ۱۰ میلی مولار آهن	۹۰±۰/۴۵
غلظت ۱۵ میلی مولار آهن	۹۴/۸±۰/۳۶

۴-۵- سنتتیک رهائش آهن در طول هضم غذا در شرایط برون بدن

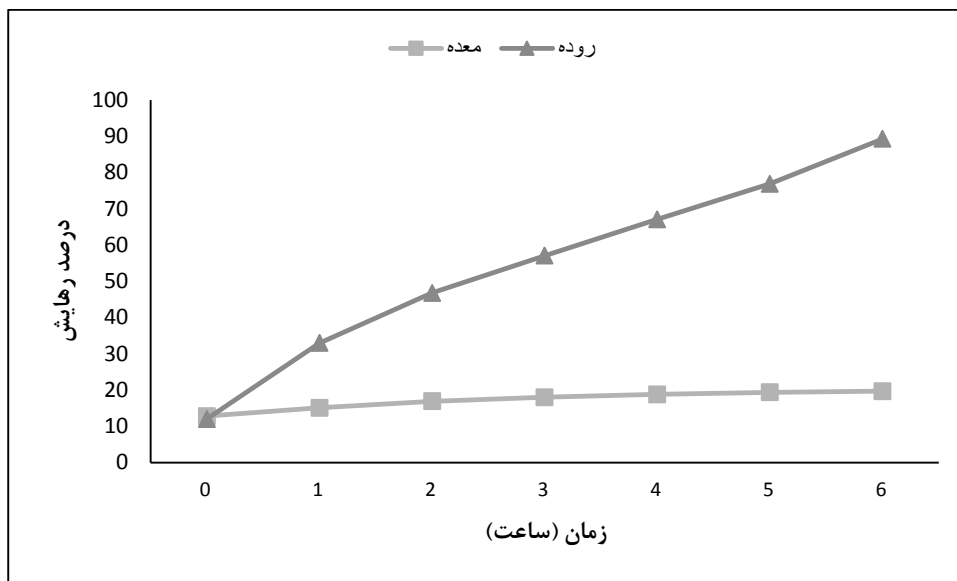
در این تحقیق شرایط رهائش آهن از درون ساختار نانوذل حین فرآیند هضم و زمانی که در معرض آنزیم‌ها و مقادیر مختلف pH قرار می‌گیرد بررسی شد [۹۳]. در سال ۱۹۷۹ بوث ول بر اساس مطالعات برون بدنی گزارش کرد که محل جذب آهن در دوازدهه^۱ و ژژونوم^۲ واقع در روده کوچک می‌باشد و جذب زیادی در ناحیه معده رخ نمی‌دهد [۹۴]. لذا هر سیستم حامل آهن باید قادر باشد تا جلوی رهائش آهن را در معده گرفته و در روده آهن را آزاد نماید.

در این مطالعه بر اساس روشی که مارتین و همکاران در سال ۲۰۱۲ برای هضم و جذب برون بدنی پیشنهاد کردند، میزان آهن رهائشده از نانوذل ایزوله پروتئین سویا حین فرآیند شبیه‌سازی شده اندازه‌گیری شد [۹]. پروفایل رهائش برای آهن در شکل ۴-۵ مشاهده می‌شود. طبق نتایج میزان رهائش آهن در شرایط شبیه‌سازی شده معده در pH=۱/۲ و در حضور پپسین بسیار کم است؛ بنابراین آهن در معده رها نشده و نانوذل به‌خوبی از آهن محافظت کرده است. رهائش آهن درون شرایط شبیه‌سازی شده روده در حضور پانکراتین با نرخ پایدار و ثابتی بعد از ۶ ساعت مشاهده شد که برای آهن حدود ۸۹/۳٪ از کل میزان آهن اولیه بود که مشابه نتیجه‌ای است که پلین و همکارانش در سال ۲۰۱۶ برای میزان رهائش آهن گزارش

¹ Duodenum

² Jejunum

کردند و بیان نمودند که این رهایش با نرخ ثابت و پایدار احتمالاً مرتبط به برهم‌کنش آهن با ماتریکس درون پوشانی کننده است. در این تحقیق در pH اسیدی در حضور پپسین ۱۹/۷٪ از آهن رهایش یافته، درحالی که در شرایط روده رهایش آهن را ۹۵٪ گزارش نمودند [۶۶].



شکل (۴-۵): رهایش آهن از نانوژل ایزوله پروتئین سویا در شرایط شبیه‌سازی دستگاه گوارش

رومندتو و همکاران در سال ۲۰۰۴ در انتقال آهن به‌وسیله ژل ایزوله پروتئین آب پنیر بیان کردند ساختار ژل روی رهایش آهن تأثیر می‌گذارد. بر اساس نتایج محققین در pH اسیدی رهایش آهن در ژل‌های دارای ذرات ریز نسبت به ژل‌های رشته‌ای بیشتر است و در مقابل در pH خنثی رهایش آهن از ژل‌های دارای ساختار رشته‌ای افزایش می‌یابد و منجر به جذب آهن در روده کوچک می‌گردد؛ بنابراین ژل‌های دارای ساختار رشته‌ای جهت حفاظت و انتقال آهن به بافت هدف مناسب‌تر هستند [۷۳]. البته باید توجه داشت که نوع ماتریکس ژل در تحقیق کنونی متفاوت از تحقیق رومندتو و همکاران (۲۰۰۴) می‌باشد.

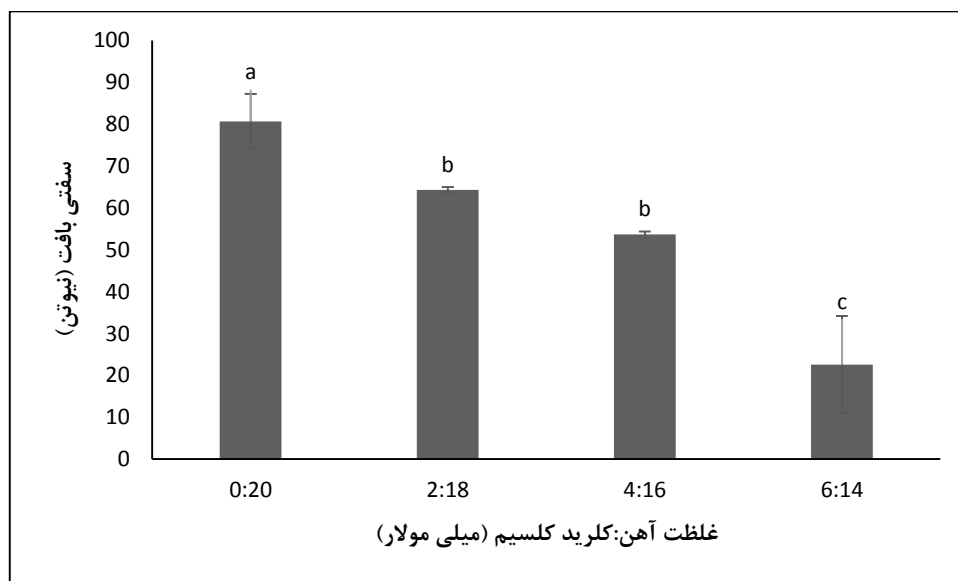
رومندتو و همکاران در سال ۲۰۰۲ جهت محافظت و انتقال آهن از بتالاکتوگلوبولین استفاده کردند و بیان نمودند که در غلظت‌های بالای آهن به پروتئین، تجمع ذرات به‌صورت تصادفی بوده است. درحالی که در

نسبت‌های پائین ساختار ژل رشته‌ای و قادر به حفاظت از آهن در شرایط معده و رهایش آن در روده می‌باشد [۵۷].

۴-۶- آنالیز پروفیل بافت ژل

۴-۶-۱- سفتی بافت

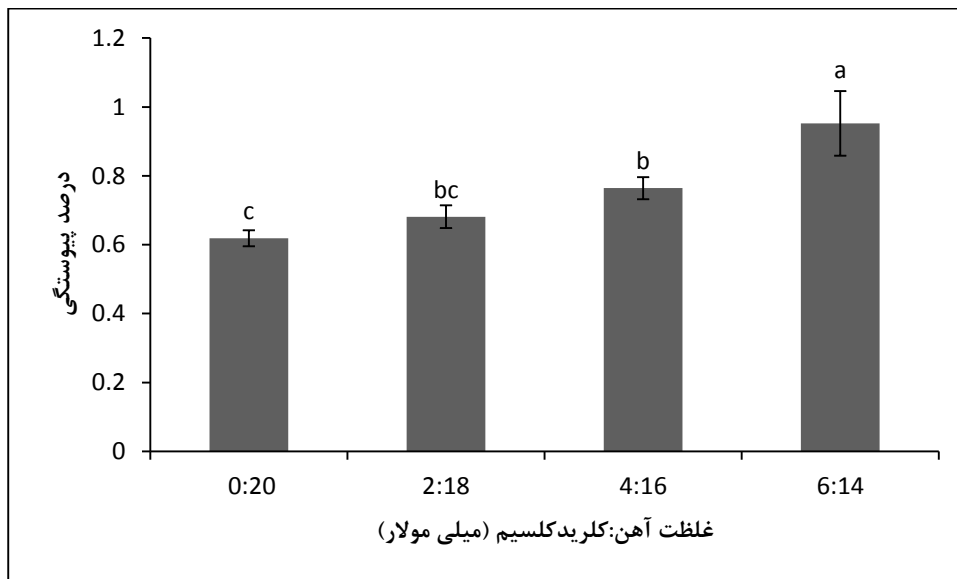
سفتی به معنای نیروی لازم برای نفوذ دندان‌های آسیاب در نمونه است که برحسب نیوتن، کیلوگرم یا گرم بیان می‌شود که در این پژوهش برحسب نیوتن گزارش شده است. سفتی (hardness) از بیشینه نیرو در آزمون فشردگی ژل در مرحله اول در منحنی نیرو (g) در مقابل زمان (s) به دست می‌آید [۹۵]. نتایج ارزیابی سفتی نمونه‌های مختلف در شکل ۴-۶ نشان داده شده است. نتایج ارائه شده نشان می‌دهد، در نمونه‌ها با افزایش غلظت کلرید کلسیم، سفتی به طور معنی‌دار افزایش می‌یابد؛ زیرا یون‌های کلسیم دافعه الکترواستاتیکی را خنثی نموده و سبب تشکیل پل‌های نمکی بیشتری بین پروتئین‌های تجمع یافته شده و نهایتاً منجر به افزایش سفتی ژل می‌گردد.



شکل (۴-۶): سفتی بافت در ژل ایزوله پروتئین سویا

۴-۶-۲- پیوستگی بافت

پیوستگی بافت معیاری از مقاومت ساختار داخلی ژل در مقابل شکسته شدن می‌باشد [۹۶] و نشان‌دهنده قدرت پیوندهای داخلی سازنده پیکره یک ماده است. در منحنی نیرو-زمان، پیوستگی، میزان مقاومت به تغییر شکل نمونه در کمپرس مرحله دوم به میزان مقاومت در کمپرس اول را نشان می‌دهد [۹۵]. شکل ۴-۷ نتایج میزان پیوستگی نمونه‌های مختلف را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود با افزایش غلظت آهن، پیوستگی افزایش می‌یابد. البته میزان این تغییرات در بیشتر نمونه‌ها اختلاف معنی‌داری را نشان نداد؛ زیرا با افزایش غلظت آهن، تنش گسیختگی در ژل کاهش می‌یابد و از طرف دیگر با افزایش غلظت آهن، توانایی نگهداری آب در ژل کاهش یافته و خروج آب از ساختار ژل سبب افزایش تراکم و پیوستگی بافت می‌شود.



شکل (۴-۷): میزان پیوستگی ژل ایزوله پروتئین سویا

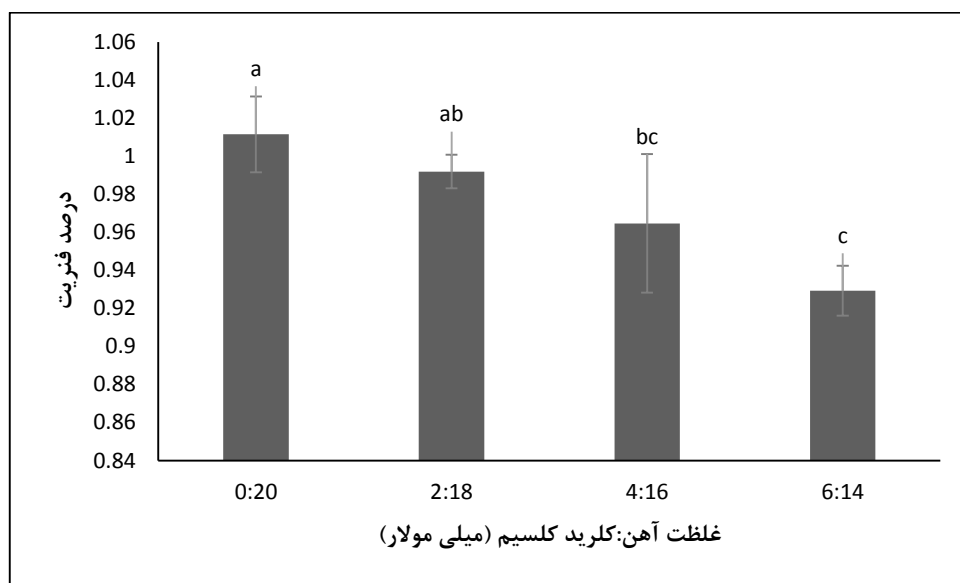
رومندتو و همکاران در سال ۲۰۰۲ نشان دادند که در ژل حاصل از بتالاکتوگلوبولین با افزایش غلظت آهن، تنش گسیختگی و توانایی نگهداری آب در ژل کاهش می‌یابد [۵۷].

۴-۶-۳- ارتجاع پذیری بافت

ارتجاع پذیری یا فنریت که گاهی از آن به عنوان الاستیسیته نام برده می شود، نشان دهنده توانایی بازگشت نمونه به حالت اول بعد از تغییر شکل وارد شده در کمپرس اول است [۹۷]. با توجه به این مطلب، ژل هایی که بعد از کمپرس اولیه، به تعداد زیادی قطعات کوچک شکسته شوند، قابلیت فنری کمتری را خواهند داشت [۹۸].

ارتجاع پذیری بافت مربوط به خصوصیات الاستیک مواد است، بنابراین هر چه میزان ارتجاع پذیری بیشتر باشد الاستیسیته ژل نیز بیشتر خواهد بود [۹۶]. یک ژل استاندارد باید قابلیت فنریت و ارتجاع پذیری خوبی داشته باشد و به راحتی در ضمن جویدن به اجزای کوچک شکسته شود [۹۹].

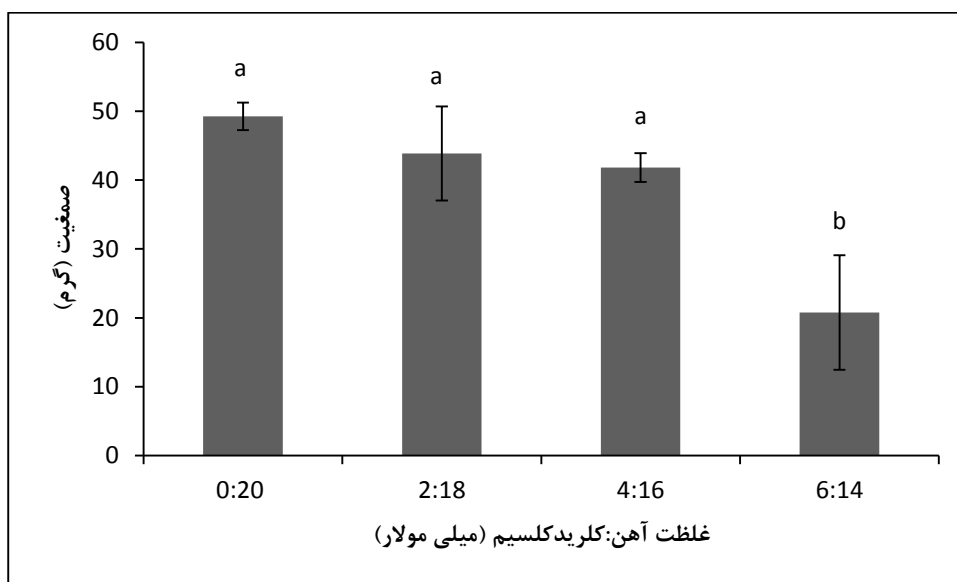
نتایج ارائه شده در شکل ۴-۸ نشان می دهد در تمامی نمونه ها با کاهش غلظت آهن فنریت ژل افزایش می یابد؛ زیرا الاستیسیته به شدت تحت تأثیر غلظت آهن و پروتئین می باشد. به گونه ای که با افزایش غلظت پروتئین و کاهش آهن، الاستیسیته افزایش می یابد.



شکل (۴-۸): میزان فنریت ژل ایزوله پروتئین سویا

۴-۶-۴-صمغی بودن

صمغیت بیانگر انرژی لازم برای جویدن و تبدیل شدن نمونه به حالت خمیری است. در واقع صمغیت نشان‌دهنده انرژی لازم برای خرد کردن غذاهای نیمه جامد تا هنگام آماده شدن برای بلعیدن است [۱۰۰]. صمغی بودن بافت ژل‌ها ارتباط مستقیم با میزان سفتی بافت دارد و هر عاملی که سبب تغییر این پارامتر شود منجر به تغییر خصوصیت صمغی بودن بافت ژل نیز خواهد شد [۱۰۱]. به‌طور کلی صمغی بودن بافت، برحسب نیوتن، کیلوگرم یا گرم گزارش می‌شود که در این پژوهش برحسب گرم گزارش شده است. همان‌طور که در شکل ۴-۹ نشان داده شده است با کاهش غلظت آهن به دلیل افزایش سفتی بافت صمغیت افزایش می‌یابد.



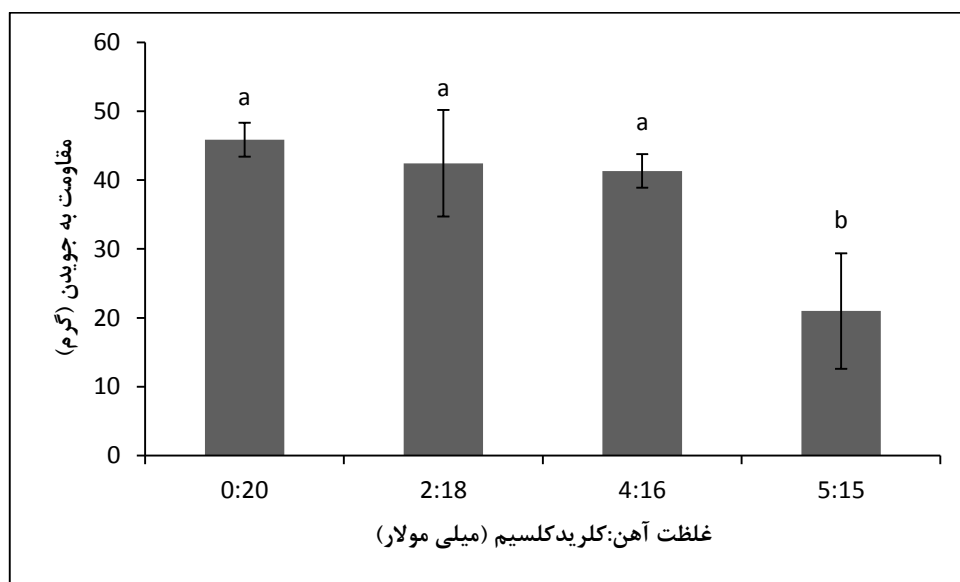
شکل (۴-۹): میزان صمغیت ژل ایزوله پروتئین سویا

۴-۶-۵- مقاومت به جویدن

مقاومت به جویدن نمونه‌های ژل به‌عنوان انرژی موردنیاز برای جویدن یک نمونه نیمه جامد و آماده شدن برای مرحله بلعیده شدن شناخته می‌شود [۹۸] و به‌عبارت‌دیگر، به تعداد دفعات جویدن مقدار معینی نمونه تا زمان آماده شدن برای بلعیدن گفته می‌شود [۱۰۲]. این پارامتر ارتباط مستقیمی با سفتی و ارتجاع پذیری

بافت دارد و برابر است با حاصل ضرب سفتی در پیوستگی و فنریت و یا حاصل ضرب صمغی بودن در میزان فنریت بافت؛ بنابراین در مقاومت به جویدن نیز سفتی بافت مهم تلقی می‌شود و همچنین عوامل مؤثر بر خاصیت صمغیت و فنریت بر مقاومت به جویدن نیز اثر دارند [۱۰۰].

مقاومت به جویدن برحسب نیوتن، کیلوگرم یا گرم گزارش می‌شود و در این پژوهش برحسب گرم گزارش شده است. همان‌طور که در شکل ۴-۱۰ مشاهده می‌شود با افزایش غلظت آهن، صمغیت و فنریت کاهش می‌یابد و در نمونه‌ای که بیشترین غلظت آهن را دارد با داشتن کمترین صمغیت و فنریت، کمترین مقاومت به جویدن را دارد.

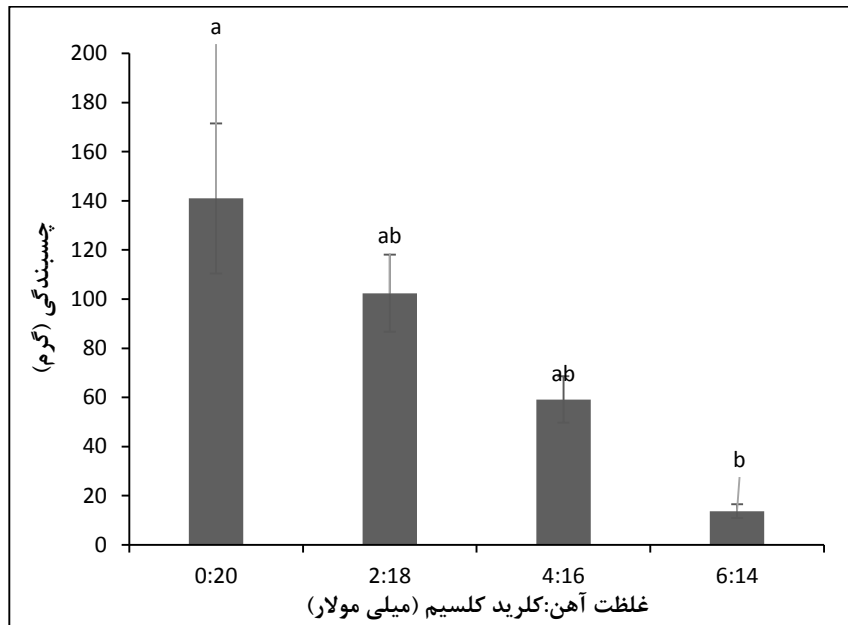


شکل (۴-۱۰): مقاومت به جویدن در ژل ایزوله پروتئین سویا

۴-۶-۶- چسبندگی

هنگامی که نمونه در دهان جویده می‌شود، مقدار چسبیدن نمونه به دهان را چسبندگی گویند [۹۶] و به‌عنوان نیروی موردنیاز برای جدا کردن نمونه از سطحی از دهان که با آن در تماس است مثل کام یا زبان شناخته می‌شود [۹۷]. چسبندگی برحسب نیوتن، کیلوگرم یا گرم گزارش می‌شود و در این پژوهش برحسب گرم

به دست آمده است. همان طور که در شکل ۴-۱۱ مشاهده می شود با افزایش غلظت آهن، چسبندگی کاهش یافته است.



شکل (۴-۱۱): چسبندگی ژل ایزوله پروتئین سویا

هانگ و همکاران در سال ۱۹۹۹ نشان دادند افزایش غلظت کلرید کلسیم در ژل ایزوله پروتئین آب پنیر از

۱۰ به ۱۲۰ میلی مولار منجر به تشکیل ژل با چسبندگی بیشتر می شود [۶۱].

۴-۱۲- نتیجه گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که بهترین شرایط برای تولید ژل از لحاظ دما و غلظت کلرید کلسیم به ترتیب ۱۲۰ درجه سانتی گراد و ۲۰ میلی مولار بود، اما فاکتور زمان حرارت دهی تأثیری بر ویژگی های ژل نداشت. به منظور بررسی اندازه ذرات از روش پرش استاتیک پرتو لیزر استفاده شد و مشاهده شد که استفاده از امواج فراصوت منجر به تولید ژلهایی با اندازه ذرات ۱۰۷ نانومتر شد. نتایج آزمون های رنگ سنجی نشان داد که با افزایش غلظت آهن درون پوشانی شده شاخص سفیدی در ژل ها به دلیل افزایش اندازه ذرات تجمع یافته افزایش یافت اما در نانوزل ها به دلیل کاهش اندازه ذرات این شاخص و شاخص قرمزی کاهش یافت. نتایج آنالیز پروفایل بافت (TPA) نشان داد با افزایش غلظت آهن درون پوشانی شده، پیوستگی ژل ها افزایش یافت اما پارامترهای سفتی، فنریت، مقاومت به جویدن، صمغیت و چسبندگی کاهش پیدا کرد. نتایج نشان داد که نانوزل ایزوله پروتئین سویا توانایی ایجاد یک سیستم تحویل پایدار در ابعاد نانومتر را دارد. طبق یافته های این بررسی می توان چنین نتیجه گیری کرد که میزان کارایی درون پوشانی با افزایش غلظت آهن افزایش یافت و بازده کپسوله شدن با افزایش غلظت آهن از ۵ به ۱۵ میلی مولار از ۷۸٪ به ۹۴٪ رسید. در بررسی رهایش در شرایط شبیه سازی شده دستگاه گوارش رهایش به صورت کنترل شده در روده رخ داد و رهایش بسیار کمی در معده رخ داد که منجر به جذب بیشتر و بهتر آهن در روده شد. نتایج این پژوهش نشان داد که انکپسولاسیون به روش ژله ای شدن سرد به دلیل هزینه پائین، عملی بودن و هم چنین پایداری بالای ریزکپسول های به دست آمده می تواند به خوبی برای اهداف غنی سازی مواد غذایی با آهن و دیگر ترکیبات زیست فعال مورد استفاده قرار گیرد و از لیگاندها به خوبی حفاظت کرده و رهایش کنترل شده و مطلوبی از خود نشان دهد.

۴-۱۳-پیشنهادات

- ۱- استفاده از روش‌هایی برای افزایش میزان بارگذاری لیگاند درون نانوذله
- ۲- استفاده از کمپلکس‌های حاصل از برهم‌کنش پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها جهت درون پوشانی
- ۳- کاربرد این نوع نانوذله‌های حاوی آهن برای غنی سازی مواد غذایی

- [1] Gaucheron, F. (2000). "Iron fortification in dairy industry". *Trends in Food Science & Technology*, 11(11), 403-409.
- [2] Martinez-Navarrete, N., Camacho, M. M., Martinez-Lahuerta, J., Martinez-Monzó, J., & Fito, P. (2002). "Iron deficiency and iron fortified foods—a review". *Food Research International*, 35(2), 225-231.
- [3] van den Broek, N. R., & Letsky, E. A. (2000). "Etiology of anemia in pregnancy in south Malawi". *The American journal of clinical nutrition*, 72(1), 247s-256s.
- [4] Gupta, C., Chawla, P., & Arora, S. (2015). "Development and evaluation of iron microencapsules for milk fortification". *CyTA-Journal of Food*, 13(1), 116-123.
- [5] Allen, L. H. (2006). "Guidelines on food fortification with micronutrients". In *Guidelines on food fortification with micronutrients*. World Health Organization. Dept. of Nutrition for Health and Development.
- [6] Hurrell, R. F., Reddy, M. B., Burri, J., & Cook, J. D. (2000). "An evaluation of EDTA compounds for iron fortification of cereal-based foods". *British Journal of Nutrition*, 84(06), 903-910.
- [7] Prichapan, N., & Klinkesorn, U. (2014). "Factor affecting the properties of water-in-oil-in-water emulsions for encapsulation of minerals and vitamins". *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*, 36, 651-661.
- [8] Sozer, N., & Kokini, J. L. (2009). "Nanotechnology and its applications in the food sector". *Trends in biotechnology*, 27(2), 82-89.
- [9] Martin, A. H., & de Jong, G. A. H. (2012). "Enhancing the in vitro Fe²⁺ bio-accessibility using ascorbate and cold-set whey protein gel particles". *Dairy science & technology*, 92(2), 133-149.
- [10] Alting, A. C. (2003). *Cold gelation of globular proteins*.
- [11] Jones, O. G., & McClements, D. J. (2011). "Recent progress in biopolymer nanoparticle and microparticle formation by heat-treating electrostatic protein-polysaccharide complexes". *Advances in Colloid and Interface Science*, 167(1), 49-62.
- [12] Lu, Q., Li, D. C., & Jiang, J. G. (2011). "Preparation of a tea polyphenol nanoliposome system and its physicochemical properties". *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(24), 13004-13011.
- [13] Fang, Z., & Bhandari, B. (2010). "Encapsulation of polyphenols—a review". *Trends in Food Science & Technology*, 21(10), 510-523.

- [14] Weiss, J., Decker, E. A., McClements, D. J., Kristbergsson, K., Helgason, T., & Awad, T. (2008). "Solid lipid nanoparticles as delivery systems for bioactive food components". *Food Biophysics*, 3(2), 146-154.
- [15] Hench, L. L., & West, J. K. (1990). "The sol-gel process". *Chemical Reviews*, 90(1), 33-72.
- [16] Sánchez, F. D., López, E. M. S., Kerstupp, S. F., Ibarra, R. V., & Scheinvar, L. (2006). "Colorant extraction from red prickly pear (*Opuntia lasiacantha*) for food application". *J. Environ. Agric. Food Chem*, 5, 1330-1337.
- [17] Joseph, T., & Morrison, M. (2006). "Nanotechnology in agriculture and food": a *nanoforum report*. Nanoforum. org.
- [18] Chen, Y., Yang, X., Zhao, L., Almásy, L., Garamus, V. M., Willumeit, R., & Zou, A. (2014). "Preparation and characterization of a nanostructured lipid carrier for a poorly soluble drug". *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 455, 36-43.
- [19] Ugustin, M. A., & Sanguansri, P. (2009). "Nanostructured materials in the food industry". *Advances in food and nutrition research*, 58, 183-213.
- [20] Chai, C. C., Peng, J., & Yan, B. P. (1996). "Characterization of α -Fe₂O₃ thin films deposited by atmospheric pressure CVD onto alumina substrates". *Sensors and Actuators B: Chemical*, 34(1), 412-416.
- [21] Rabenau, A. (1985). "The role of hydrothermal synthesis in preparative chemistry". *Angewandte Chemie International Edition in English*, 24(12), 1026-1040.
- [22] Kaidashev, E. M., Lorenz, M. V., Von Wenckstern, H., Rahm, A., Semmelhack, H. C., Han & Grundmann, M. (2003). "High electron mobility of epitaxial ZnO thin films on c-plane sapphire grown by multistep pulsed-laser deposition". *Applied Physics Letters*, 82(22), 3901-3903.
- [23] Yang, H., Xiao, Y., Liu, K., & Feng, Q. (2008). "Chemical precipitation synthesis and optical properties of ZnO/SiO₂ nanocomposites". *Journal of the American Ceramic Society*, 91(5), 1591-1596.
- [24] Gedanken, A. (2004). "Using sonochemistry for the fabrication of nanomaterials". *Ultrasonics sonochemistry*, 11(2), 47-55.
- [25] Chandrapala, J., Zisu, B., Palmer, M., Kentish, S., & Ashokkumar, M. (2011). "Effects of ultrasound on the thermal and structural characteristics of proteins in reconstituted whey protein concentrate". *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(5), 951-957.
- [26] Yurdugul, S. E. Y. H. U. N., & Mozafari, M. R. (2004). "Recent advances in micro-and nanoencapsulation of food ingredients". *Cell Mol Biol Lett*, 9(S2), 64-65.

- [27] Gonnet, M., Lethuaut, L., & Boury, F. (2010). "New trends in encapsulation of liposoluble vitamins". *Journal of Controlled Release*, 146(3), 276-290.
- [28] Liu, W., Tian, R., Hu, W., Jia, Y., Jiang, H., Zhang, J., & Zhang, L. (2012). "Preparation and evaluation of self-microemulsifying drug delivery system of baicalein". *Fitoterapia*, 83(8), 1532-1539.
- [29] Bédié, G. K., Turgeon, S. L., & Makhoul, J. (2008). "Formation of native whey protein isolate–low methoxyl pectin complexes as a matrix for hydro-soluble food ingredient entrapment in acidic foods". *Food Hydrocolloids*, 22(5), 836-844.
- [30] Gomez-Hens, A., & Fernandez-Romero, J. M. (2006). "Analytical methods for the control of liposomal delivery systems". *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 25(2), 167-178.
- [31] McClements, D. J., & Li, Y. (2010). "Structured emulsion-based delivery systems: Controlling the digestion and release of lipophilic food components". *Advances in colloid and interface science*, 159(2), 213-228.
- [32] Kaushik, V., & Roos, Y. H. "Effects of different homogenization processes on olive oil encapsulation in freeze dried sugar/gelatin matrices". *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 38, 1288-1294.
- [33] Thassu, D., Deleers, M., & Pathak, Y. V. (Eds.). (2007). *Nanoparticulate drug delivery systems* (Vol. 166). CRC Press.
- [34] Limayem, I., Charcosset, C., & Fessi, H. (2004). "Purification of nanoparticle suspensions by a concentration/diafiltration process". *Separation and Purification Technology*, 38(1), 1-9.
- [35] Shimoni, E., Edited, B., & Gustavo, B. C. (2009). "Nanotechnology for foods: delivery systems". In *IUFoST World Congress Book: Global Issues in Food Sci. Technol* (pp. 411-424).
- [36] Taylor, T. M., Weiss, J., Davidson, P. M., & Bruce, B. D. (2005). "Liposomal nanocapsules in food science and agriculture". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(7-8), 587-605.
- [37] Yang, Y., Marshall-Breton, C., Leser, M. E., Sher, A. A., & McClements, D. J. (2012). "Fabrication of ultrafine edible emulsions: Comparison of high-energy and low-energy homogenization methods". *Food Hydrocolloids*, 29(2), 398-406.
- [38] Tadros, T., Izquierdo, P., Esquena, J., & Solans, C. (2004). "Formation and stability of nano-emulsions". *Advances in colloid and interface science*, 108, 303-318.
- [39] Zimet, P., Rosenberg, D., & Livney, Y. D. (2011). "Re-assembled casein micelles and casein nanoparticles as nano-vehicles for ω -3 polyunsaturated fatty acids". *Food Hydrocolloids*, 25(5), 1270-1276.

- [40] Couvreur, P., & Puisieux, F. (1993). "Nano-and microparticles for the delivery of polypeptides and proteins". *Advanced Drug Delivery Reviews*, 10(2), 141-162.
- [41] Young, V. R. (1991). "Soy protein in relation to human protein and amino acid nutrition". *Journal of the American Dietetic Association*, 91(7), 828-835.
- [42] Liu, K. (1997). "Chemistry and nutritional value of soybean components". In *Soybeans* (pp. 25-113). Springer US.
- [43] Westfall, P. H., Nardelli, C. A., & Schimpf, K. J. (1993). *U.S. Patent No. 5,270,450*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- [44] Hermansson, A. M. (1985). "Structure of soya glycinin and conglycinin gels". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 36(9), 822-832.
- [45] Mession, J. L., Blanchard, C., Mint-Dah, F. V., Lafarge, C., Assifaoui, A., & Saurel, R. (2013). "The effects of sodium alginate and calcium levels on pea proteins cold-set gelation". *Food Hydrocolloids*, 31(2), 446-457.
- [46] De Jong, S., Klok, H. J., & Van de Velde, F. (2009). "The mechanism behind microstructure formation in mixed whey protein-polysaccharide cold-set gels". *Food Hydrocolloids*, 23(3), 755-764.
- [47] Sasaki, Y., & Akiyoshi, K. (2010). "Nanogel engineering for new nanobiomaterials: from chaperoning engineering to biomedical applications". *The Chemical Record*, 10(6), 366-376.
- [48] Alting, A. C., Hamer, R. J., de Kruif, C. G., & Visschers, R. W. (2003). "Cold-set globular protein gels: interactions, structure and rheology as a function of protein concentration". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(10), 3150-3156.
- [49] Lu, X., Lu, Z., Yin, L., Cheng, Y., & Li, L. (2010). "Effect of preheating temperature and calcium ions on the properties of cold-set soybean protein gel". *Food research international*, 43(6), 1673-1683.
- [50] Ye, A., & Taylor, S. (2009). Characterization of cold-set gels produced from heated emulsions stabilized by whey protein". *International Dairy Journal*, 19(12), 721-727.
- [51] Martin, A. H., & de Jong, G. A. H. (2012). "Impact of protein pre-treatment conditions on the iron encapsulation efficiency of whey protein cold-set gel particles". *European Food Research and Technology*, 234(6), 995-1003.
- [52] Chung, C., Degner, B., & McClements, D. J. (2013). "Creating novel food textures: Modifying rheology of starch granule suspensions by cold-set whey protein gelation". *LWT-Food Science and Technology*, 54(2), 336-345.

- [53] Vilela, J. A. P., Cavallieri, Â. L. F., & Da Cunha, R. L. (2011). "The influence of gelation rate on the physical properties/structure of salt-induced gels of soy protein isolate–gellan gum". *Food Hydrocolloids*, 25(7), 1710-1718.
- [54] Kuhn, K. R., Cavallieri, Â. L. F., & Da Cunha, R. L. (2011). "Cold-set whey protein–flaxseed gum gels induced by mono or divalent salt addition". *Food Hydrocolloids*, 25(5), 1302-1310.
- [55] Kuhn, K. R., Cavallieri, Â. L. F., & Da Cunha, R. L. (2010). "Cold-set whey protein gels induced by calcium or sodium salt addition". *International journal of food science & technology*, 45(2), 348-357.
- [56] Maltais, A., Remondetto, G. E., Gonzalez, R., & Subirade, M. (2005). "Formation of soy protein isolate cold-set gels: protein and salt effects". *Journal of Food Science*, 70(1), C67-C73.
- [57] Remondetto, G. E., Paquin, P., & Subirade, M. (2002). "Cold Gelation of β -lactoglobulin in the Presence of Iron". *Journal of Food Science*, 67(2), 586-595.
- [58] Anderson, V. J., & Jones, R. A. L. (2001). "The influence of gelation on the mechanism of phase separation of a biopolymer mixture". *Polymer*, 42(23), 9601-9610.
- [59] Bryant, C. M., & McClements, D. J. (2000). "Influence of NaCl and CaCl₂ on Cold-Set Gelation of Heat-denatured Whey Protein". *Journal of Food Science*, 65(5), 801-804.
- [60] Bryant, C. M., & McClements, D. J. (2000). "Influence of sucrose on NaCl-induced gelation of heat denatured whey protein solutions". *Food Research International*, 33(8), 649-653.
- [61] Hongsprabhas, P., Barbut, S., & Marangoni, A. G. (1999). "The structure of cold-set whey protein isolate gels with ca⁺⁺". *LWT-Food Science and Technology*, 32(4), 196-202.
- [62] Barbut, S. (1997). Relationships between optical and textural properties of cold-set whey protein gels". *LWT-Food Science and Technology*, 30(6), 590-593.
- [63] Barbut, S., & Drake, D. (1997). "Effect of reheating on sodium-induced cold gelation of whey proteins". *Food research international*, 30(2), 153-157.
- [64] Hongsprabhas, P., & Barbut, S. (1997). "Protein and Salt Effects on Ca²⁺-Induced Cold Gelation of Whey Protein Isolate". *Journal of Food Science*, 62(2), 382-385.
- [65] Hongsprabhas, P., & Barbut, S. (1997). "Effects of N-ethylmaleimide and CaCl₂ on cold gelation of whey protein isolate". *Food research international*, 30(6), 451-455
- [66] Onsekizoglu Bagci, P., & Gunasekaran, S. (2016). "Iron-encapsulated cold-set whey protein isolate gel powder–Part 1: Optimisation of preparation conditions and in vitro evaluation". *International Journal of Dairy Technology*.

- [67] Abbasi, A., Emam-Djomeh, Z., Mousavi, M. A. E., & Davoodi, D. (2014). "Stability of vitamin D 3 encapsulated in nanoparticles of whey protein isolate". *Food chemistry*, 143, 379-383.
- [68] Cavallieri, Â. L. F., & Cunha, R. L. (2009). "Cold-set whey protein gels with addition of polysaccharides". *Food Biophysics*, 4(2), 94-105.
- [69] Maltais, A., Remondetto, G. E., & Subirade, M. (2009). "Soy protein cold-set hydrogels as controlled delivery devices for nutraceutical compounds". *Food Hydrocolloids*, 23(7), 1647-1653.
- [70] Maltais, A., Remondetto, G. E., & Subirade, M. (2010). "Tabletted soy protein cold-set hydrogels as carriers of nutraceutical substances". *Food Hydrocolloids*, 24(5), 518-524.
- [71] Cavallieri, A. L. F., & Da Cunha, R. L. (2008). "The effects of acidification rate, pH and ageing time on the acidic cold set gelation of whey proteins". *Food Hydrocolloids*, 22(3), 439-448.
- [72] Cavallieri, A. L. F., Costa-Netto, A. P., Menossi, M., & Da Cunha, R. L. (2007). "Whey protein interactions in acidic cold-set gels at different pH values". *Le Lait*, 87(6), 535-554.
- [73] Remondetto, G. E., Beyssac, E., & Subirade, M. (2004). "Iron availability from whey protein hydrogels: an in vitro study". *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(26), 8137-8143.
- [74] Azizi, R., & Farahnaky, A. (2016). "Ultrasound assisted-viscosifying of kappa carrageenan without heating". *Food Hydrocolloids*, 61, 85-91.
- [75] Farahnaky, A., Azizi, R., Majzoobi, M., Mesbahi, G., & Maftoonazad, N. (2013). "Using power ultrasound for cold gelation of kappa-carrageenan in presence of sodium ions". *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 20, 173-181.
- [76] Azizi, R., & Farahnaky, A. (2013). "Ultrasound assisted cold gelation of kappa carrageenan dispersions". *Carbohydrate polymers*, 95(1), 522-529.
- [77] Farahnaky, A., Azizi, R., Majzoobi, M., Mesbahi, G., & Maftoonazad, N. (2013). "Using power ultrasound for cold gelation of gelatin". *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 20, 173-181.
- [78] Azizi, R., & Farahnaky, A. (2012). "Ultrasound assisted-viscosifying of kappa carrageenan and gelatin without heating". *Food Hydrocolloids*, 70, 93-99.
- [79] McClements, D. J., & Li, Y. (2010). "Structured emulsion-based delivery systems: Controlling the digestion and release of lipophilic food components". *Advances in colloid and interface science*, 159(2), 213-228.

- [80] Jafari, S. M., He, Y., & Bhandari, B. (2007). "Optimization of nano-emulsions production by microfluidization". *European Food Research and Technology*, 225(5-6), 733-741.
- [81] Jena, S., & Das, H. (2006). "Modeling of particle size distribution of sonicated coconut milk emulsion: effect of emulsifiers and sonication time". *Food research international*, 39(5), 606-611.
- [82] Afshari-Jouybari, H., & Farahnaky, A. (2011). "Evaluation of Photoshop software potential for food colorimetry". *Journal of Food Engineering*, 106(2), 170-175.
- [83] Hamishehkar, H., Emami, J., Najafabadi, A. R., Gilani, K., Minaiyan, M., Mahdavi, H., & Nokhodchi, A. (2009). "The effect of formulation variables on the characteristics of insulin-loaded poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres prepared by a single phase oil in oil solvent evaporation method". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 74(1), 340-349.
- [84] Szczesniak, A. S. (2002). "Texture is a sensory property". *Food quality and preference*, 13(4), 215-225.
- [85] Bourne, M. (2002). "Food texture and viscosity: concept and measurement". Academic press.
- [86] Szczesniak, A. S. (1963). "Classification of textural characteristics". *Journal of food science*, 28(4), 385-389.
- [87] Maltais, A., Remondetto, G. E., & Subirade, M. (2008). "Mechanisms involved in the formation and structure of soya protein cold-set gels: A molecular and supramolecular investigation". *Food Hydrocolloids*, 22(4), 550-559.
- [88] Renkema, J. M., & van Vliet, T. (2002). "Heat-induced gel formation by soy proteins at neutral pH". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(6), 1569-1573.
- [89] Renkema, J. M. S., Knabben, J. H. M., & Van Vliet, T. (2001). "Gel formation by β -conglycinin and glycinin and their mixtures". *Food Hydrocolloids*, 15(4), 407-414.
- [90] Maltais, A., Remondetto, G. E., Gonzalez, R., & Subirade, M. (2005). "Formation of soy protein isolate cold-set gels: protein and salt effects". *Journal of Food Science*, 70(1), C67-C73.
- [91] Sugiarto, M., Ye, A., & Singh, H. (2009). "Characterisation of binding of iron to sodium caseinate and whey protein isolate". *Food Chemistry*, 114(3), 1007-1013.
- [92] Reddy, M. I., & Mahoney, A. W. (1991). "A study of the interaction of Fe (III) with bovine α s1-casein using ultraviolet and fluorescence spectroscopy". *Journal of Dairy Science*, 74, D59.
- [93] Aceituno-Medina, M., Mendoza, S., Rodríguez, B. A., Lagaron, J. M., & López-Rubio, A. (2015). "Improved antioxidant capacity of quercetin and ferulic acid during in-vitro

digestion through encapsulation within food-grade electrospun fibers”. *Journal of Functional Foods*, 12, 332-341.

[94] Bothwell, T. H., Charlton, R. W., Cook, J. D., & Finch, C. A. (1979). “Iron metabolism in man”. *Iron metabolism in man*.

[95] Hill, R. F. R. S., Storakers, B., & Zdunek, A. B. (1989, June). “A theoretical study of the Brinell hardness test”. In *Proceedings of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* (Vol. 423, No. 1865, pp. 301-330). The Royal Society.

[96] Hurler, J., Engesland, A., Poorahmary Kermany, B., & Škalko-Basnet, N. (2012). “Improved texture analysis for hydrogel characterization: gel cohesiveness, adhesiveness, and hardness”. *Journal of Applied Polymer Science*, 125(1), 180-188.

[97] Bourne, M. (2002). “Food texture and viscosity: concept and measurement”. Academic press.

[98] Phimolsiripol, Y., Siripatrawan, U., & Henry, C. J. K. (2011). “Pasting behaviour, textural properties and freeze–thaw stability of wheat flour–crude malva nut (*Scaphium scaphigerum*) gum system”. *Journal of Food Engineering*, 105(3), 557-562.

[99] Gwartney, E. A., Larick, D. K., & Foegeding, E. A. (2004). “Sensory texture and mechanical properties of stranded and particulate whey protein emulsion gels”. *Journal of Food Science*, 69(9), S333-S339.

[100] Raphaelides, S., Antoniou, K. D., & Petridis, D. (1995). “Texture evaluation of ultrafiltered Teleme cheese”. *Journal of Food Science*, 60(6), 1211-1215.

[101] Goksel, M., Dogan, M., Toker, O. S., Ozgen, S., Sarioglu, K., & Oral, R. A. (2013). “The effect of starch concentration and temperature on grape molasses: rheological and textural properties”. *Food and Bioprocess Technology*, 6(1), 259-271.

[102] Saitoh, E., Shibata, S., Matsuo, K., Baba, M., Fujii, W., & Palmer, J. B. (2007). “Chewing and food consistency: effects on bolus transport and swallow initiation”. *Dysphagia*, 22(2), 100-

Abstract

Iron is an essential trace element in human nutrition that its deficiency is to lead the most common nutritional deficiency in the world such as anemia, mental retardation, reduction in growth rate and increasing the risk of dying in childbirth. Iron encapsulation is an effective method to improve its biological efficiency such as insolubility, controlled delivery (in given amount and place) and prevention of side complications. In this research production of cold-set soy protein isolate nanogel in transport and release of iron have been studied. To find optimal conditions for production of cold-set gel, soy protein isolate solution heated at different temperatures (80-120°C) and times (20-180 min) and different concentrations of Calcium Chloride (5-50 mM). The best conditions in terms of temperature and concentration were 120 °C and 20 mM respectively. According to the results variation of time had no effect on gel's properties. The size of nanogel particles was determined using a static light scattering. The results showed that ultrasound method at a frequency of 20 kHz, constant power of 90 W and an amplitude of 75% is used to produce a gel with 107 nm particle size. About gels appearance, results showed that increasing in iron caused to increase L* value while L* and a* factor of nanogels decreased due to particle size reduction. Under the circumstance, efficient encapsulation and capability of soy protein were to keep iron bound in any condition. The increase in iron concentration leads to increase in encapsulation efficiency as it raised from 78% to 94.8%. Comparatively higher content of the iron released in simulated intestinal condition (89.3%) that was considerably more than simulated gastric condition (19.7%).

The texture of the gels were evaluated by using texture analyzer. Results obtained with the TPA showed that cohesiveness increased with higher iron concentration while hardness, chewiness, springiness, guminess and adhesiveness decreased.

Key words: Soy protein isolate; Encapsulation; Cold-set gel; Nanogel; Iron release; Ultrasound



Faculty of Agriculture
M.Sc. Thesis in Food Industry

**Effect of temperature, time and concentration on the iron encapsulation within soy
protein isolate cold-set nanogels**

By: Sima Samanian

Supervisor:

Dr. Ahmad Rajaei

Dr. Seyyed Mohammad Hashem Hoseini

February 2017