

تولید کرایوژل و زیروژل کتیرا-ایزوله پروتئین آب پنیر به منظور بارگذاری و رهش کنترل شده سیلی مارین

نوشین نیک نیا، رسول کدخدایی*

۱. دکتری، گروه شیمی مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد
۲. دانشیار، گروه نانوفناوری مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد

(تاریخ دریافت: ۹۶/۸/۸، تاریخ بازنگری: ۹۶/۱۰/۲، تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۰/۹)

چکیده

سیلی مارین یک مخلوط فلانوئیدی است که اثرات ضد دیابتی آن به گستردگی مورد مطالعه قرار گرفته و به اثبات رسیده است. در این پژوهش نمونه‌های کرایوژل و زیروژل مخلوط کتیرا-ایزوله پروتئین آب پنیر حاوی سیلی مارین تهیه شد و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، بافتی، مکانیکی و ریزساختار آن‌ها با آزمون‌های طیف سنجی مادون قرمز، جذب و دفع نیتروژن، بافت سنجی و میکروسکوپ الکترونی مورد بررسی قرار گرفت. علاوه بر این نرخ تورم این ساختارها و نیز آهنگ رهش سیلی مارین از آن‌ها در شرایط اسیدی و قلیایی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج آزمون‌ها حاکی از این بود که کرایوژل‌ها ساختاری متخلخل و شبکه‌ای از حفرات باز و به هم پیوسته داشتند، اما زیروژل‌ها بافتی بسیار فشرده و متراکم همراه با حفرات بسته و غیرمرتبط از خود نشان دادند. افزودن کتیرا به ایزوله پروتئین آب پنیر سبب بهبود خصوصیات فیزیکی، مکانیکی و مورفولوژیکی ژل‌های خشک گردید، درحالی که سیلی مارین موجب افزایش تخلخل و تضعیف قدرت مکانیکی و مورفولوژیکی آن‌ها شد. بارگذاری سیلی مارین هم‌چنین سبب کاهش نسبت تورم ساختارهای خشک گردید. این تغییرات که نتیجه برهم‌کنش‌های بین ملکولی کتیرا، ایزوله پروتئین آب پنیر و سیلی مارین می باشد، با آزمون FTIR مورد تایید قرار گرفت. نتایج رهش سیلی مارین نشان داد که بخش عمده سیلی مارین بارگذاری شده (۸۰ درصد) در طول دوره بررسی رهش از کرایوژل آزاد شد، درحالی که در این شرایط تنها ۳۰ درصد از سیلی مارین بارگذاری شده از زیروژل خارج گردید. در مورد هر دو ساختار نرخ رهش در شرایط قلیایی بیش‌تر از شرایط اسیدی بود. نتایج مدل‌سازی ریاضی نشان داد که رهش سیلی مارین از کرایوژل و زیروژل‌های ایزوله پروتئین آب پنیر-کتیرا بر مبنای مدل کورسمیر-پپاس قابل پیش بینی است.

واژه‌های کلیدی: کرایوژل، زیروژل، کتیرا، ایزوله پروتئین آب پنیر، سیلی مارین، رسانش.

۱- مقدمه

نیک‌نیا و کدخدایی انجام شد، ساختارهای ژلی بر مبنای کتیرا به صورت فیزیکی تولید [۶] و به صورت موفقیت آمیزی برای بارگذاری سیلی‌مارین مورد استفاده قرار گرفت [۷].

ایزوله پروتئین آب پنیر مخلوط پیچیده‌ای از پروتئین‌های بتا-لاکتوگلوبولین (۷۰ درصد)، آلفا-لاکتوآلبومین (۲۵ درصد)، سرم آلبومین و ایمونوگلوبولین‌ها (۵ درصد) می‌باشد. خصوصیات عملکردی ایزوله پروتئین آب پنیر به‌طور عمده متأثر از بتا-لاکتوگلوبولین آن است [۸]. از روش‌های مختلفی می‌توان برای تشکیل ژل ایزوله پروتئین آب پنیر استفاده کرد، روش سرد، تشکیل ژل در غلظت‌های پایین‌تر پروتئین را فراهم می‌کند. تشکیل ژل با این روش فرایندی دو مرحله‌ای می‌باشد که با دناتوراسیون پروتئین‌ها در دمای بالای ۷۰ درجه سانتی‌گراد و تشکیل تجمعات محلول از مولکول‌های پروتئینی آغاز می‌گردد و در مرحله بعد با تغییر دادن قدرت یونی محیط (افزودن یون) و یا تغییر pH ژل تشکیل می‌گردد [۹]. در پژوهش‌هایی که تاکنون صورت پذیرفته‌اند از پلی‌ساکاریدهای پکتین با درجه استریفیکاسیون پایین و بالا [۱۰-۱۲]، زانتان [۱۳] و نشاسته [۱۴] به همراه ایزوله پروتئین آب پنیر و افزودن یون‌های کلسیم و سدیم برای تشکیل ژل مخلوط به روش سرد استفاده شده است.

حذف آب از هیدروژل‌ها و ایجاد ساختارهای خشکی که بتوان ماده مؤثره را بعداً در آن‌ها بارگذاری کرد مرحله چالشی تهیه این دسته از سامانه‌های رسانش محسوب می‌شود، زیرا در صورت نامناسب بودن شرایط، آسیب‌های میکروسکوپی و ماکروسکوپی به بافت ژل راندمان ریزپوشانی و نرخ رهش را تحت تاثیر قرار می‌دهد. به دو روش می‌توان ساختارهای ژلی را خشک کرد: خشک کردن مادون بحرانی (برای مثال با به گردش درآوردن هوای داغ در اطراف نمونه) و خشک کردن انجمادی. ساختارهای خشکی که در نهایت با این روش‌ها به دست می‌آیند به ترتیب زیروژل و کریوژل نامیده می‌شوند [۷].

سیلی‌مارین یک ترکیب زیست فعال گیاهی است که متشکل از چندین فلاونوئید می‌باشد و از عصاره بذر گیاه خار مریم با نام علمی *Silybum marianum* استخراج می‌شود. این ترکیب دارای قدرت آنتی‌اکسیدانی بسیار قوی می‌باشد. مطالعات متعدد نشان داده‌اند که ترکیبات دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی

هیدروژل ساختاری سه بعدی است که در آن زنجیرهای پلیمری آبدوست از طریق اتصالات جانبی فیزیکی و یا شیمیایی به هم متصل شده‌اند. این ساختار در آب متورم شده، ولی دچار ازهم پاشیدگی و یا انحلال نمی‌گردد و از آن اغلب برای بارگذاری و رسانش ترکیبات آبدوست و آبریز استفاده می‌شود. عموماً ژل حاصل از یک هیدروکلونید به تنهایی، از استحکام کافی برخوردار نیست. از این رو با به‌کارگیری همزمان دو نوع هیدروکلونید علاوه بر بهبود ساختار ژل، می‌توان رهش ماده مؤثره را نیز کنترل نمود [۱]. از مزایای دیگر ژل‌های مخلوط این است که به دلیل هم‌افزایی ویژگی‌های عملکردی، غلظت مورد نیاز دو پلیمر به مراتب کم‌تر از حالتی است که هر کدام از آن‌ها به تنهایی برای تشکیل ژل استفاده می‌شود [۲]. از هیدروکلونیدهای غیرسمی و با سازگاری زیستی نظیر کیتوزان، کتیرا، آلژینات، پکتین، ایزوله پروتئین آب پنیر و کاراگینان به‌طور عمده برای تشکیل ساختارهای ژلی استفاده می‌شود.

کتیرا یک پلیمر طبیعی است که توسط بوته‌های کوچک آستراگالوس، به‌ویژه آستراگالوس میکروسفالیوس و گامیفر تولید می‌شود [۳] و به‌عنوان یک هیدروکلونید با کیفیت در فهرست افزوده‌های کلاً ایمن قرار دارد [۴]؛ به‌علاوه ثابت شده که مصرف دائمی آن باعث تعدیل قند خون در بیماران دیابتی می‌شود [۵]. این صمغ ناهمگون متشکل از حداقل دو جزء است: بخش متورم شونده در آب (باسورین) و بخش محلول در آب (تراگاکانتین). دو جزء محلول و نامحلول در آب کتیرا از لحاظ ساختار شیمیایی، محتوای قندی، میزان اورونیک اسید و گروه‌های عاملی از جمله متیل و آسپیل متفاوت بوده و از لحاظ ویژگی‌های عملکردی نیز با هم تفاوت دارند.

تاکنون در پژوهش‌هایی که به‌منظور بارگذاری ترکیبات مؤثره در ژل کتیرا صورت گرفته‌اند، از ترکیبات اتصال دهنده جانبی سمی استفاده شده است که می‌بایست باقی‌مانده آن‌ها را پس از اتمام واکنش از محیط حذف کرد، به‌علاوه احتمال واکنش ماده مؤثره با ترکیب اتصال دهنده نیز وجود دارد. معایب فوق‌الذکر کاربرد ژل‌های شیمیایی کتیرا را در مواد غذایی محدود می‌کند. در پژوهشی که برای نخستین بار توسط

به مدت ۳ ساعت بر روی همزن مغناطیسی، جهت تکمیل آب پوشانی یک شب در داخل یخچال نگهداری گردید. به منظور دنا توره کردن ایزوله پروتئینی آب پنیر از حمام آب (Julabo, F12-ED, Germany) با دمای ۹۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد. محلول ذخیره صمغ کتیرا با غلظت ۳ درصد (وزنی/وزنی) تهیه و به منظور آب پوشانی کامل و پس از افزودن سدیم آزید (۰/۰۲ درصد) به مدت یک شب بر روی همزن مغناطیسی به آرامی همزده شد.

۲-۱-۲-۱- تهیه هیدروزل ایزوله پروتئین آب پنیر (نمونه شاهد)
برای تهیه هیدروزل ایزوله پروتئین آب پنیر، پس از رقیق سازی محلول ذخیره با آب یون زدایی شده و تنظیم غلظت پروتئین در ۶ درصد (وزنی/وزنی)، کلرید کلسیم به محلول پروتئینی اضافه شد تا غلظت آن به ۱۰ میلی مولار برسد و پس از همزدن ملایم مخلوط اجازه داده شد تا در دمای یخچال به تدریج ژل پروتئینی تشکیل شود.

۲-۱-۲-۲- تهیه ژل مخلوط کتیرا-ایزوله پروتئین آب پنیر
ابتدا به ۲/۶۶ گرم محلول ذخیره کتیرا، مقدار ۰/۰۱۴۷ گرم کلرید کلسیم و ۱/۳۴ گرم آب دیونیزه اضافه شد و به مدت ۲/۵ ساعت توسط همزن مغناطیسی به طور کامل مخلوط گردید. سپس دیسپرسیون همگن به دست آمده به تدریج توسط سمپلر به ۶ گرم از محلول ذخیره ایزوله پروتئین آب پنیر دنا توره شده اضافه شد. به این ترتیب در ۱۰ گرم مخلوط نهایی غلظت پروتئین ۶ درصد (وزنی/وزنی)، کلرید کلسیم ۱۰ میلی مولار و کتیرا ۰/۸ درصد (وزنی/وزنی) تنظیم گردید. مخلوط حاصله به داخل قالب‌های استوانه‌ای شکلی به ارتفاع ۵ میلی متر و قطر ۲۸ میلی متر منتقل و به منظور بستن و تشکیل ژل به مدت یک شب در یخچال قرار داده شدند.

۲-۱-۲-۳- بارگذاری سیلی مارین در ساختار ژل مخلوط کتیرا-ایزوله پروتئین آب پنیر

به منظور بارگذاری سیلی مارین، ابتدا ۰/۰۳ گرم پودر سیلی مارین با ۲/۶۶ گرم محلول ذخیره کتیرا مخلوط و به مدت یک شب جهت انحلال کامل، توسط همزن مغناطیسی

اثرات مطلوبی بر روی اختلالات متابولیکی ناشی از افزایش قند خون دارند. سیلی مارین باعث افزایش آنزیم‌های دفع کننده رادیکال‌های آزاد در کبد می‌شود، به علاوه به عنوان یک مهار کننده قوی لیبوپراکسیدان باعث کاهش مقدار گلوکز خون می‌شود. حلالیت بسیار پایین سیلی مارین در محلول‌های آبی سبب کاهش دسترسی زیستی آن در بدن می‌گردد [۱۵]. برای این منظور پژوهش‌های متعددی در خصوص درون پوشانی این ترکیب در ساختارهای لیپیدی صورت گرفته‌اند که تا حدودی در زمینه افزایش حلالیت سیلی مارین موفق بودند. عیب اصلی این روش‌ها که کاربرد آن‌ها را در صنعت غذا محدود می‌نماید، استفاده از ترکیبات فعال سطحی در غلظت‌های بالا و نیز به کارگیری حلال‌های سمی در طی فرایند تولید آن‌ها می‌باشد.

پژوهش حاضر با هدف به دام اندازی سیلی مارین در سامانه‌های بیوپلیمری به منظور افزایش حلالیت و نیز کنترل نرخ رهش آن در شرایط مشابه دستگاه گوارش انجام شده است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

کتیرای نوع نواری (آ. گوسیپینوس) از یکی از عطاری‌های مشهد خریداری شد. سیلی مارین و سدیم آزید (با حداقل خلوص ۹۹/۵ درصد) از شرکت سیگما (Sigma Alderich, Germany) تهیه شدند. هیدروکسید سدیم، کلرید کلسیم دو آب و اسید کلریدریک از شرکت مرک (Merck, UK) فراهم شدند. ایزوله پروتئین آب پنیر توسط شرکت داویسکو (Davisco International Company, USA) در اختیار قرار داده شد که مطابق اطلاعات تولید کننده، دارای خلوص پروتئینی ۹۶/۲ درصد بود. برای تهیه کلیه محلول‌ها آب یون زدایی شده مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۲- تهیه ژل کتیرا-ایزوله پروتئین آب پنیر

۲-۲-۱- آماده سازی محلول ذخیره ایزوله پروتئین آب پنیر و دیسپرسیون صمغ کتیرا

محلول ذخیره ایزوله پروتئین آب پنیر ۱۰ درصد (وزنی/وزنی) حاوی سدیم آزید (۰/۰۲ درصد) تهیه و پس از همزدن

مختلف نمونه‌ها صورت گرفت و نتایج به‌صورت میانگین گزارش شدند [۱۷] چگالی توده‌ای با استفاده از رابطه (۱) و از تقسیم جرم به حجم نمونه‌ها محاسبه گردید:

$$\rho_b = m/A \times h \quad (1)$$

در این رابطه m وزن نمونه‌های زیروژل (گرم)، A مساحت سطح (سانتی‌متر مربع) و h ضخامت (سانتی‌متر) آن‌ها می‌باشد.

تخلخل (ϕ) نمونه‌ها با در دست داشتن چگالی ذاتی و توده‌ای از رابطه (۲) محاسبه شد:

$$\phi = (1 - \rho_b / \rho_s) \times 100 \quad (2)$$

حجم ویژه حفرات (V_{sp})، که عبارت است از حجم کلی حفرات به ازای واحد جرم نمونه‌های ژل از رابطه (۳) محاسبه شد [۱۸]:

$$V_{sp} = 1/\rho_b - 1/\rho_s \quad (3)$$

۲-۴-۳- تعیین مساحت سطح ویژه

مساحت سطح ویژه نمونه های زیروژل و کرایوژل با روش جذب و دفع نیتروژن در دمای پایین تعیین شد. تمامی نمونه‌ها قبل از آنالیز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گاززدایی و رطوبت‌زدایی شدند. مساحت سطح ویژه با روش BET تعیین شد [۱۸].

۲-۵- ارزیابی مکانیکی ساختارهای کرایوژل

برای بررسی پایداری مکانیکی نمونه‌ها از آزمون فشار (تراکم) توسط دستگاه بافت‌سنج TA.XT plus, Stable micro system, England استفاده شد. در این آزمون نمونه‌های کرایوژل مکعبی شکل به ابعاد $1 \times 1 \times 1$ سانتی‌متر مکعب تحت نیروی تک محوره به میزان ۲۵ درصد ارتفاع اولیه خود فشرده شدند. میزان بارگذاری ۵ کیلوگرم، قطر پروب استوانه‌ای شکل ۵۰ میلی‌متر و نرخ پیشروی آن ۱۰ میلی‌متر بر دقیقه در نظر گرفته شد [۱۹].

به آرامی همزده شد. سپس ۱۴۷/۰ گرم کلرید کلسیم و ۱/۳۴ گرم آب دیونیزه به آن افزوده شد و مدت ۳۰ دقیقه دیگر همزدن ادامه یافت. دیسپرسیون نهایی حاوی کتیرا، سیلی‌مارین و کلرید کلسیم به ۶ گرم از محلول ذخیره ایزوله پروتئین آب‌پنیر دناتوره شده به تدریج اضافه گردید و فرایند تشکیل ژل مشابه بخش‌های قبلی انجام شد. غلظت نهایی سیلی‌مارین در ژل نهایی ۰/۳ درصد (وزنی/حجمی) تنظیم گردید.

۲-۳- تهیه زیروژل، کرایوژل مخلوط کتیرا- ایزوله پروتئین آب‌پنیر خالص و بارگذاری شده

ژل‌های ترکیبی تهیه شده، به دو گروه تقسیم شدند: دسته اول پس از انجماد با خشک‌کن انجمادی (Operon CO, FDO-8606, Korea) با دمای ۸۸- درجه سانتی‌گراد و فشار ۵۰ میلی‌بار و دسته دوم به آون با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت انتقال داده شدند. تمامی نمونه‌های کرایوژل با تیغ به صورت مکعب‌هایی به ابعاد $1 \times 1 \times 1$ سانتی‌متر مکعب برش داده شدند و تا زمان آنالیز همراه با نمونه‌های زیروژل خشک شده در آون (قطر متوسط: $2/85 \pm 0/351$ میلی متر، ضخامت متوسط: $2/85 \pm 0/351$ میلی متر)، در دسیکاتورهای جداگانه نگهداری گردیدند.

۲-۴-۲- ارزیابی خصوصیات فیزیکی و ساختاری نمونه های زیروژل و کرایوژل

۲-۴-۲-۱- اندازه‌گیری چگالی ذاتی

چگالی ذاتی (ρ_p) ژل‌های خشک پس از پودر کردن کامل آن‌ها توسط پیکنومتر هلیوم multipycnometer, Quantachrome در دمای ۲۹۸ کلوین (۲۵ درجه سانتی‌گراد) و فشار ۱/۳ بار تعیین شد [۱۶].

۲-۴-۲-۲- اندازه‌گیری چگالی توده‌ای

چگالی توده‌ای (ρ_b) کرایوژل‌ها با اندازه‌گیری وزن مکعب‌های $1 \times 1 \times 1$ سانتی‌متری محاسبه شد. ضخامت و قطر نمونه‌های زیروژل هم با میکرومتر دیجیتال Mitutoyo, Manufacturing Co. ساخت ژاپن و با دقت ۰/۰۰۱ میلی‌متر اندازه گرفته شد. اندازه‌گیری‌ها در حداقل ۵ نقطه تصادفی از قسمت‌های

۶-۲- ارزیابی مکانیکی ساختارهای زیروژل

مقاومت مکانیکی نمونه‌های زیروژل نسبت به تنش فشاری با آزمون شکست بررسی شد. برای این منظور نمونه‌ها بر روی پایه حلقه‌ای (TA-101) قرار داده شدند و توسط دستگاه بافت سنج TA.XT plus, Stable micro system, England با پروب کرووی شکل به قطر ۶/۳۵ میلی‌متر تحت فشار قرار گرفتند تا از وسط شکسته شوند. سرعت حرکت پروب ۱۰ میلی‌متر بر ثانیه تنظیم شد [۲۰].

۷-۲- ارزیابی ساختار میکروسکوپی نمونه‌های کرایوژل و زیروژل

به منظور بررسی ریز ساختار کرایوژل‌ها، نمونه‌های تهیه شده توسط خشک‌کن انجمادی با استفاده از تیغ به صورت مکعب‌هایی با اضلاع ۰/۵ سانتی‌متر برش داده شدند. در مورد نمونه‌های زیروژل برش دایره‌ای شکلی به قطر تقریبی ۵ میلی‌متر از آن‌ها تهیه شد و سپس تک تک نمونه‌ها به کمک چسب نقره بر روی پایه‌های آلومینیومی چسبانده شدند. پایه‌ها در دستگاه پوشش‌دهنده Polaron, E5200C, Oxford خشک شده و برای رسانی بیشتر به مدت ۵ دقیقه با لایه نازکی از طلا پوشش داده شدند. تصویربرداری از نمونه‌ها با میکروسکوپ الکترونی روبشی Oxford, UK با ولتاژ شتاب‌دهندگی ۲۰ کیلوولت انجام گرفت.

۸-۲- طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR)

جهت بررسی برهمکنش‌های احتمالی بین اجزا آزمون FTIR بر روی نمونه‌های خشک شده با خشک‌کن انجمادی انجام شد. به این منظور پس از خشک کردن نمونه‌ها، با استفاده از هاون چینی کوبیده شدند و بعد از رقیق شدن با برمید پتاسیم به نسبت ۱ به ۱۰۰ طیف تبدیل فوریه مادون قرمز آن‌ها توسط طیف سنج مادون قرمز Avatar 370 FTIR, USA تهیه شد. طیف‌ها در حالت عبوری و در محدوده عدد موجی ۴۰۰ تا ۴۰۰۰ بر سانتی‌متر و ضریب تفکیک ۲ بر سانتی‌متر به دست آمدند.

۹-۲- ارزیابی تورم ساختارهای کرایوژل و زیروژل

نرخ تورم ژل‌های خشک شده ابتدا با قرار دادن نمونه‌ها در

محلول اسید کلریدریک (pH=۱/۲) به مدت ۲ ساعت و در ادامه با انتقال همان نمونه‌ها به بافر فسفات (pH=۷/۴) به مدت ۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مورد ارزیابی قرار گرفت. در فواصل زمانی معین، تعداد مشخصی از ژل‌های خشک (پس از حذف رطوبت سطحی) توزین شدند و نسبت تورم آن‌ها از رابطه ۴ محاسبه شد:

$$\text{Swelling ratio} = \left(\frac{M_t}{M_0} \right) \quad (4)$$

در این رابطه M_t و M_0 به ترتیب وزن ژل در زمان t و شروع آزمون می‌باشد [۲۱].

۱۰-۲- ارزیابی پروفایل و سینتیک رهش سیلی‌مارین از ساختارهای کرایوژل و زیروژل

رهش تجمعی سیلی‌مارین از نمونه‌های ژل، با گرمخانه‌گذاری (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) وزن مشخصی از آن‌ها در اسید کلریدریک (pH=۱/۲) و نیز بافر فسفات (pH=۷/۴) با برقراری شرایط سینک [۲۲]، به ترتیب به مدت ۲ و ۶ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت. در طی این بازه زمانی و در فواصل مشخص حجم معینی (۳ میلی‌لیتر) برداشته شد و پس از قرائت جذب آن در طول موج بیشینه سیلی‌مارین (۳۲۵ نانومتر) دوباره به محیط اصلی برگردانده شد. درصد سیلی‌مارین آزاد شده در هر ساعت با تقسیم عدد جذب قرائت شده به عدد جذب مربوط به خروج کامل سیلی‌مارین از ذرات محاسبه گردید [۲۳].

به منظور توصیف الگوی رهش سیلی‌مارین از کرایوژل و زیروژل‌ها، مدل‌های ریاضی درجه صفر، درجه اول، هیگوچی و کورسمیر-پاس به کار برده شدند و بر اساس میزان ضریب تعیین R^2 ، RMSE و χ^2 مورد ارزیابی قرار گرفتند. در مدل درجه صفر که مطابق رابطه (۵) بیان می‌گردد:

$$Q_t = K_0 t \quad (5)$$

Q_t مقدار ماده آزاد شده در زمان t و K_0 ثابت رهش درجه صفر می‌باشد. معادله درجه صفر سامانه‌هایی را توصیف می‌کند که رهش ماده از آن‌ها مستقل از غلظت آن می‌باشد [۲۴].

به کار برده شد. مدلسازی و محاسبات مربوط به تعیین ضرایب سینتیک رهش سیلی مارین با کمک نرم افزار متلب صورت گرفت و نمودارها توسط نرم افزار اکسل (۲۰۱۳) ترسیم شدند.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- ارزیابی خصوصیات فیزیکی

در جدول (۱) خصوصیات ساختاری کرایوژل‌ها و زیروژل‌ها شامل چگالی توده‌ای، درصد تخلخل، مساحت سطح ویژه، حجم حفرات (کل، میکرو و مزو، ماکرو) آورده شده است. زیروژل‌ها چگالی توده‌ای بالاتر و تخلخل کم‌تری نسبت به کرایوژل‌ها داشتند. از طرف دیگر مساحت سطح ویژه و حجم کلی حفرات کرایوژل‌ها بالاتر از زیروژل‌ها بود. کرایوژل ایزوله پروتئین آب‌پنیر که به روش سرد تشکیل شده بود، دارای ساختار بسیار متخلخل و چگالی توده‌ای فوق‌العاده پایین بود. چن و همکاران نیز برای چگالی کرایوژل ایزوله پروتئین آب پنیر عددی مشابه را گزارش نمودند [۲۸]. با افزودن کتیرا و تهیه کرایوژل ترکیبی، چگالی افزایش پیدا کرد. احتمالاً برهمکنش‌های الکترواستاتیک بین گروه‌های کربوکسیلات کتیرا و نواحی بار الکتریکی مثبت در سطح پروتئین و نیز برقراری پل‌های کلسیم بین پروتئین و پلی‌ساکارید سبب تقویت و تراکم ساختار ژل پروتئینی و در نتیجه افزایش چگالی شد.

در پژوهش‌های مشابه از آلژینات و نیز نانو و میکرو کریستال‌های سلولز برای تقویت ساختار ژل ایزوله پروتئین آب پنیر استفاده شده است. چن و همکاران بیان داشتند که با افزودن آلژینات به کرایوژل ایزوله پروتئین آب پنیر، چگالی آن از ۰/۰۵۹ به ۰/۱۲۹ گرم بر سانتی‌متر مکعب افزایش یافت [۲۸]. احمدی و همکاران نیز محدوده چگالی ۰/۱۶-۰/۱۱ گرم بر سانتی‌متر مکعب را برای کرایوژل‌های ایزوله پروتئین آب‌پنیر-میکرو و نانو کریستال‌های سلولز گزارش کردند [۲۹].

با افزودن سیلی مارین به دیسپرسیون اولیه ایزوله پروتئین آب‌پنیر-کتیرا، چگالی نمونه‌های کرایوژل و زیروژل در مقایسه با ژل‌های ترکیبی خالص کاهش یافت. سیلی مارین دارای گروه‌های هیدروکسیل فوق‌العاده فعال می‌باشد. از این رو به احتمال زیاد برهمکنش این گروه‌ها از طریق تشکیل پیوند

در مدل درجه اول، سرعت رهش ماده از ذرات وابسته به غلظت آن می‌باشد و بر اساس معادله لگاریتمی رابطه (۶) بیان می‌شود [۲۵]:

$$\log Q_t = \log Q_0 + \frac{K_1 t}{2.303} \quad (6)$$

مدل هیگوجی سرعت رهش ماده از یک شبکه نامحلول را بر مبنای انتشار فیک و به‌عنوان تابعی از ریشه دوم زمان رهش توصیف می‌کند [۲۶]. مدل مذکور به‌صورت رابطه (۷) بیان می‌شود که در آن f_t غلظت ماده موثره آزاد شده در زمان t و HK ثابت انتشار یا ثابت انحلال هیگوجی می‌باشد.

$$f_t = K_H t^{1/2} \quad (7)$$

مدل کورسمیر-پپاس مکانیسم رهش ماده را تلفیقی از انتشار ساده (قانون فیک) و انتقال نوع II (انتشار آب به داخل شبکه ماده حامل و تورم آن) در نظر می‌گیرد و به‌صورت رابطه (۸) بیان می‌شود:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = Kt^n \quad (8)$$

در این عبارت M_t مقدار ماده آزاد شده در زمان t ، M_∞ مقدار کل ماده موجود در شبکه، k ثابت سرعت رهش ماده که بیانگر ویژگی‌های شبکه ماکرومولکولی حامل است، و n توان انتشار می‌باشد که معرف مکانیسم رهش است. برای رهش مبتنی بر انتشار فیک از شبکه حامل مقدار عددی آن $0/43 < n < 0/89$ می‌باشد. این مدل II $0/85$ و حالت تلفیقی $0/89 < n < 0/43$ می‌باشد. اغلب به منظور بررسی الگوی رهش از سیستم‌های پلیمری به کار برده می‌شود [۲۷].

۲-۱۱- آنالیز آماری

به‌منظور بررسی تاثیر متغیرهای مختلف بر درون پوشانی و رهش سیلی مارین، آزمایشات در غالب طرح کاملاً تصادفی و آنالیز واریانس با استفاده از نرم افزار SPSS (نسخه ۱۹) در سطح معنی‌دار $0/05$ ($p < 0/05$) انجام شد. برای مقایسه میانگین‌ها آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان

جدول (۱) خصوصیات فیزیکی کرایوژل‌ها و زیروژل‌های کتیرا-ایزوله پروتئین آب پنیر خالص و بارگذاری شده سیلی-مارین

Table 1 Physical characteristics of pure and SM-loaded gum tragacanth-WPI cryo- and xerogels

کرایوژل Cryogel	دانسیته توده‌ای ρ_{bulk} (g.cm ⁻³)	درصد تخلخل $\phi\%$	سطح ویژه a_s (m ² .g ⁻¹)	حجم حفرات میکرو و مزو V (micro- +mesopores) (cm ³ .g ⁻¹)	حجم حفرات ماکرو V macropores (cm ³ .g ⁻¹)	حجم کل V total (cm ³ .g ⁻¹)
ایزوله پروتئین آب-پنیر WPI	0.057 ^a ±0.002	94.79 ^c ±1.23	58.85 ^c ±2.23	0.25	16.37	16.62
ایزوله پروتئین آب-پنیر- کتیرا WPI-GT	0.141 ^c ±0.001	90.72 ^a ±0.35	38.23 ^a ±1.23	0.40	6.03	6.43
ایزوله پروتئین آب-پنیر- کتیرا-سیلی-مارین WPI-GT-SM	0.125 ^b ±0.004	91.78 ^b ±0.41	40.60 ^b ±1.07	0.32	7.02	7.34
زیروژل Xerogel						
ایزوله پروتئین آب-پنیر WPI	0.995 ^a ±0.001	9.13 ^c ±0.14	10.06 ^b ±1.55	0.08	0.01	0.09
ایزوله پروتئین آب-پنیر- کتیرا WPI-GT	1.412 ^c ±0.002	7.16 ^a ±0.17	7.17 ^a ±0.98	0.04	0.01	0.05
ایزوله پروتئین آب-پنیر- کتیرا-سیلی-مارین WPI-GT-SM	1.325 ^b ±0.001	8.94 ^b ±0.22	8.98 ^{ab} ±1.37	0.05	0.02	0.07

۳-۲- ارزیابی خصوصیات مکانیکی

نمونه‌های زیروژل و کرایوژل تهیه شده از ایزوله پروتئین آب پنیر فوق‌العاده ترد و شکننده بودند و خصوصیات مکانیکی ضعیفی داشتند. با افزودن کتیرا به ژل پروتئینی، کتیرا به‌عنوان پرکننده ساختار عمل کرده و سبب بهبود خصوصیات مکانیکی ژل‌های ترکیبی شد. یکی از روش‌هایی که برای افزایش استحکام شبکه می‌توان استفاده کرد، افزودن پلیمر ثانویه به ساختار می‌باشد. در پژوهشی که چن و همکاران انجام دادند به‌منظور تقویت ساختار کرایوژل ایزوله پروتئین آب پنیر از آلژینات به‌عنوان پرکننده ساختار استفاده کردند و مشاهده کردند که آلژینات سبب بهبود افزایش سختی و

هیدروژنی با گروه‌های هیدروکسیل و کربوکسیل کتیرا و ایزوله پروتئین آب پنیر از فشرده شدن پروتئین و پلی‌ساکارید در کنار هم ممانعت کرده و سبب تشکیل ساختار بازتر با تخلخل بیش‌تر و چگالی توده‌ای کم‌تر گردید. در پژوهشی که وو و همکاران بر روی تاثیر پلی‌فنل‌های چای بر رتروگراداسیون نشاسته انجام دادند نیز مشاهده کردند که ترکیبات پلی‌فنلی از نزدیک شدن مولکول‌های نشاسته به هم ممانعت به‌عمل آوردند [۳۰]. هم‌چنین بررسی تاثیر افزودن عصاره چای سبز بر فیلم ایزوله پروتئین آب پنیر نشان داد که ترکیبات پلی‌فنلی عصاره چای سبز از نزدیک شدن مولکول‌های پروتئینی بهم جلوگیری کرده و سبب کاهش چگالی فیلم پروتئینی گردیدند [۳۱].

شبکه ژلی خشک مشاهده می‌شوند. با افزودن کتیرا، و پر شدن حفرات، اندازه آن‌ها کاهش پیدا کرد؛ در حالی که سیلی‌مارین اضافه شده به سیستم از تشکیل شبکه فشرده پروتئین و پلی‌ساکارید، و تشکیل حفرات ریز ممانعت به عمل آورد. توزیع اندازه حفرات در روش خشک کردن انجمادی به تعادل بین آهنگ تشکیل هسته و رشد کریستال‌های یخ وابسته است. به نظر می‌رسد سیلی‌مارین که به‌طور عمده محلول در فاز پراکنده کتیرا می‌باشد، با کاهش نقطه انجماد و در نتیجه افزایش مدت زمان انجماد، سبب تشکیل کریستال‌های یخ بزرگ‌تر در شبکه ژلی شده است. این کریستال‌های یخ درشت اندازه پس از تصعید حفرات بزرگی در شبکه کرایوژل ایجاد می‌کنند. در پژوهشی که به منظور تشکیل کرایوژل پروتئین گلوتن انجام شد، با افزودن گلیسرول اثر مشابهی مشاهده شد [۳۲].

نمونه‌های زیروژل، به‌طور کلی دارای سطوح زبر و ناصاف بودند. زیروژل ایزوله پروتئین آب پنیر حاوی ترک‌های میکروسکوپی بود که در سرتاسر شبکه توزیع شده بودند. حضور این ترک‌ها می‌تواند مربوط به ساختار ضعیف ژل پروتئینی اولیه و عدم تحمل تنش‌های ناشی از تبخیر آب به هنگام خشک کردن در آن باشد. اضافه کردن کتیرا ساختار ژل را تغییر داد، به‌طوری که ترک‌ها از ساختار آن حذف شد و زیروژل دارای ظاهر فشرده و یکنواختی بود که مؤید توزیع یکنواخت کتیرا در

ضریب کشسانی کرایوژل‌های ترکیبی گردید [۲۸]. خصوصیات مکانیکی ژل‌های خشک تا حدود زیادی به برهمکنش‌های درون و برون زنجیره‌ای و آرایش زنجیره‌های پلیمرهای موجود در شبکه دارد. به نظر می‌رسد سیلی‌مارین اضافه شده به مخلوط پروتئین-پلی‌ساکارید، به احتمال زیاد با قرارگیری در بین زنجیره‌های پلیمری از نزدیک شدن آن‌ها بهم و تشکیل ژل قوی ممانعت می‌کند. اوگنیا و کوران نیز گزارش کردند که با افزودن ترکیبات پلی‌فنلی چای سبز به فیلم پروتئین آب‌پنیر، فیلم حاصل ضعیف‌تر شد و بیان داشتند که ترکیبات پلی‌فنلی احتمالاً با کم کردن برهمکنش‌های پلیمری، ساختار شبکه پلیمری را تحت تاثیر قرار می‌دهند [۳۱].

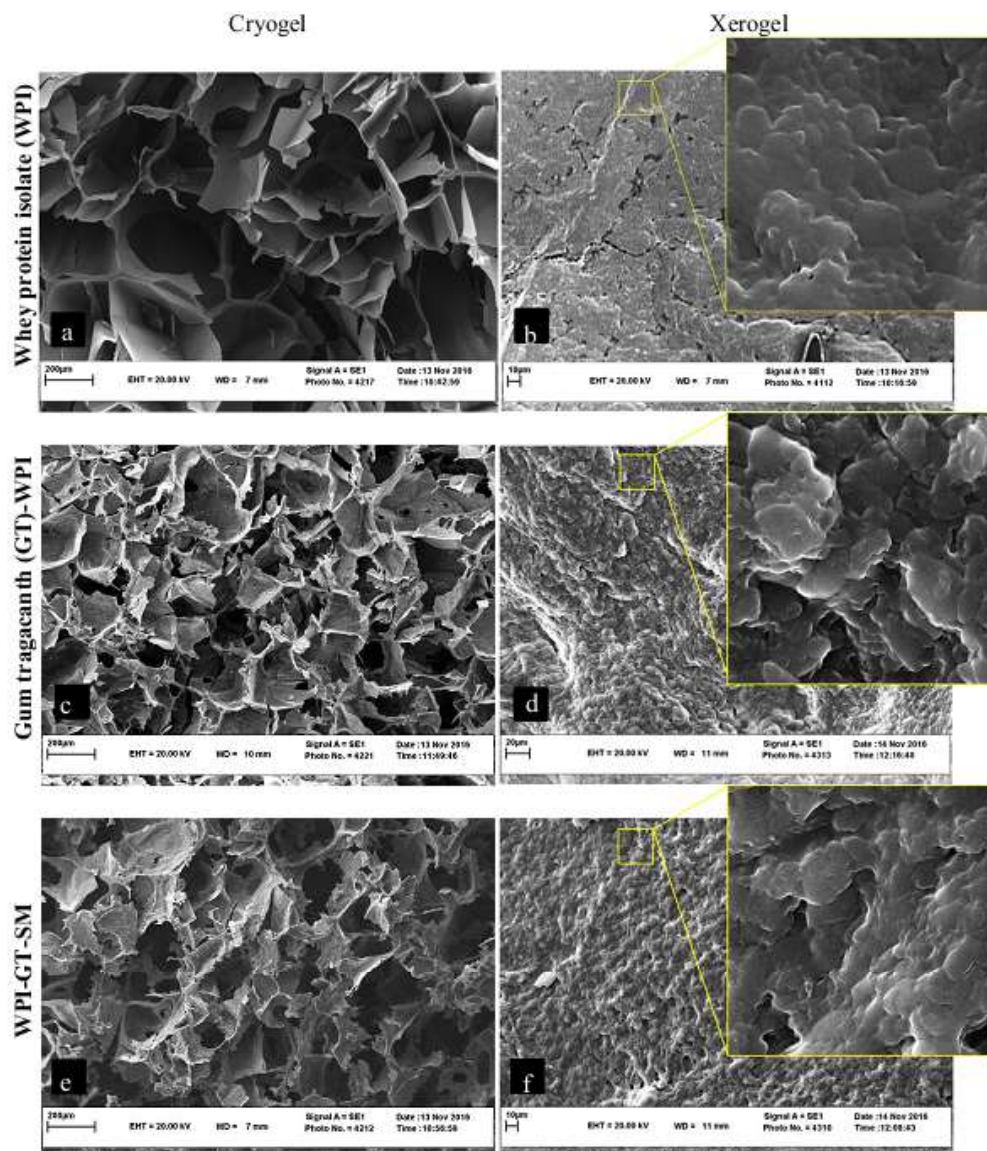
۳-۳- ارزیابی ساختار میکروسکوپی

در شکل (۱) تصاویر میکروسکوپ الکترونی نمونه‌های کرایوژل و زیروژل نشان داده شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود، کرایوژل تهیه شده از ایزوله پروتئین آب‌پنیر به علت غلظت پایین پروتئین دارای ساختار باز با حفرات ماکروسکوپی است. ساختار میکروسکوپی کرایوژل‌ها، به نحوه تشکیل کریستال‌های یخ در مرحله انجماد بستگی دارد [۲۱]. با کاهش آهنگ انجماد، تعداد هسته‌های کم‌تری شکل گرفته، کریستال‌های تشکیل شده بزرگ‌تر شده و به صورت حفرات با اندازه بزرگ در

جدول (۲) خصوصیات مکانیکی نمونه‌های کرایوژل و زیروژل‌های خالص و بارگذاری شده با سیلی‌مارین

Table 2 Mechanical characteristics of pure and SM-loaded cryo- and xerogels

زیروژل Xerogel		کرایوژل Cryogel		نمونه Sample
مدول ظاهری Apparent modulus (g/s)	سفتی Hardness (g)	مدول ظاهری Apparent modulus (g/s)	سفتی Hardness (g)	
6345.237 ^a ±15.98	1042.111 ^a ±11.32	43.850 ^a ±1.26	162.347 ^a ±3.76	ایزوله پروتئین آب-پنیر WPI
16491.931 ^c ±24.54	2205.634 ^c ±16.54	101.78 ^c ±2.34	550.680 ^c ±4.45	ایزوله پروتئین آب-پنیر-کتیرا WPI-GT
9661.155 ^b ±27.75	1743.884 ^b ±21.23	60.978 ^b ±3.13	285.905 ^b ±6.88	ایزوله پروتئین آب-پنیر-کتیرا-سیلی-مارین WPI-GT-SM



شکل (۱) تصاویر میکروسکوپ الکترونی کرایوژل و زیروژل خالص و بارگذاری شده: (a و b) کرایوژل و زیروژل ایزوله پروتئین آب پنیر خالص، (c و d) کرایوژل و زیروژل ترکیبی کتیرا-ایزوله پروتئین آب پنیر خالص، (e و f) کرایوژل و زیروژل ترکیبی بارگذاری شده با سیلی-مارین (SM).

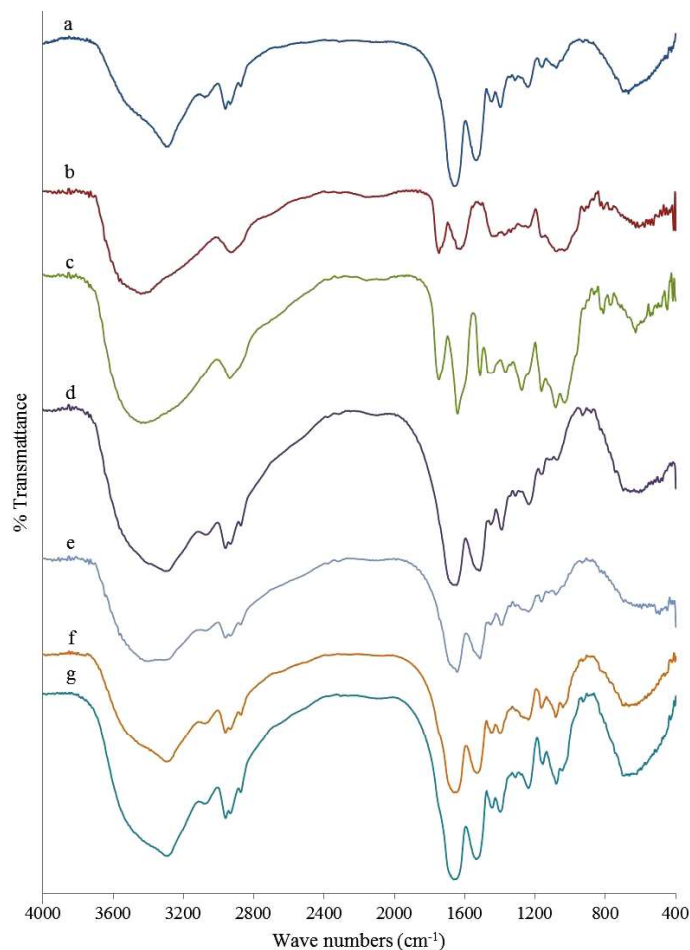
Fig. 1 Scanning electron micrographs of pure and SM-loaded cryo- and xerogels: (a, b) pure WPI cryo- and xerogels, (c, d) pure gum tragacanth-WPI cryo- and xerogels, (e, f) SM-loaded gum tragacanth-WPI cryo- and xerogels.

فاز پیوسته پروتئینی و نیز متراکم شدن زنجیرهای بیوپلیمری در کنار هم می‌باشد. مشاهدات مشابهی در سامانه ژلی پروتئین ژلاتین ماهی به واسطه افزودن صمغ‌های آنیونی ژلان و پکتین نیز گزارش شده است [۳۳، ۳۴]. بهبود ساختار میکروسکوپی ژل ایزوله پروتئین آب پنیر در حضور کتیرا در راستای نتایج آزمون بافتی بود. نمونه زیروژل حاوی سیلی-مارین دارای سطح زبر و ناهمگون‌تری بود که ذرات به صورت تجمعاتی ناپیوسته در کنار هم قرار گرفته بودند.

۳-۴- طیف سنجی FTIR

طیف‌های FTIR کرایوژل‌های خالص و بارگذاری شده ایزوله پروتئین آب پنیر-کتیرا در شکل (۲) نشان داده شده‌اند. در

فاز پیوسته پروتئینی و نیز متراکم شدن زنجیرهای بیوپلیمری در کنار هم می‌باشد. مشاهدات مشابهی در سامانه ژلی پروتئین ژلاتین ماهی به واسطه افزودن صمغ‌های آنیونی ژلان و پکتین نیز گزارش شده است [۳۳، ۳۴]. بهبود ساختار میکروسکوپی ژل ایزوله پروتئین آب پنیر در حضور کتیرا در راستای نتایج آزمون بافتی بود. نمونه زیروژل حاوی سیلی-مارین دارای سطح



شکل (۲) طیف‌های مادون قرمز (a) سیلی‌مارین، (b) پودر کتیرا، (c) کتیرا - سیلی‌مارین، (d) ایزوله پروتئین آب پنیر دناتور، (e) ایزوله پروتئین آب پنیر دناتور - سیلی‌مارین، (f) ژل ترکیبی کتیرا-ایزوله پروتئین آب پنیر خالص و (g) ژل ترکیبی حاوی سیلی‌مارین.

Fig. 2 FTIR Spectra of a) SM, b) gum tragacanth powder, d) heat denaturated WPI, e) WPI-SM, f) pure gum tragacanth-WPI gel and g) SM-loaded gum tragacanth-WPI gel.

می‌باشد. در مورد کتیرا، باند پهن در عدد موجی ۳۴۰۸ بر سانتی‌متر مربوط به ارتعاشات کششی OH- است. گروه‌های هیدروکسیل پلی‌ساکاریدها قابلیت بالایی برای تشکیل پیوند هیدروژنی با گروه‌های هیدروکسیل و کربوکسیل پروتئین‌ها دارند [۳۵]. پیک‌های مشاهده شده در اعداد موجی ۱۶۲۳، ۱۴۲۹ و ۱۳۶۷ بر سانتی‌متر کتیرا مربوط به کشش نامتقارن و متقارن گروه کربوکسیلات می‌باشند. پیک‌های جذبی متعدد در محدوده ۱۱۷۵-۱۱۴۰ بر سانتی‌متر تمام پلی‌ساکاریدها مربوط به پیوند گلیکوزیدی C-O-C بوده و باندهای ناحیه ۱۰۷۰-۱۰۳۰ بر سانتی‌متر ناشی از ارتعاشات کششی حلقه پیرانوز پلی‌ساکاریدها هستند.

طیف ایزوله پروتئین آب پنیر در محدوده عدد موجی ۳۰۰۰ تا ۳۶۰۰ بر سانتی‌متر، دو پیک با اعداد موجی ۳۰۵۲ و ۳۲۷۰ بر سانتی‌متر مربوط به کشش OH- و NH- مشاهده می‌شود. باندهای آمیدی I و II از مهم‌ترین باندهای ارتعاشی اسکلت پروتئین هستند. باندهای ارتعاشی مربوط به نواحی آمیدی I و II از مهم‌ترین شاخص‌های زنجیر اصلی پروتئینی می‌باشند. باند آمیدی I (محدوده ۱۷۰۰-۱۶۰۰ بر سانتی‌متر) مربوط به ارتعاشات کششی پیوند پپتیدی C=C بوده و حساس به ساختار دوم پروتئین است، در حالی‌که باند آمیدی II (۱۵۰۰-۱۴۰۰ بر سانتی‌متر) ناشی از خمش درون صفحه‌ای NH- (۶۰-۴۰ درصد) و ارتعاش کششی CN- (۴۰-۱۸ درصد)

سیلیمارین پهن شدند (ارتعاشات کششی OH-) و یا به اعداد موجی پایین تر انتقال پیدا کردند. این جابه‌جایی‌ها احتمالاً به دلیل برهمکنش فیزیکی از نوع پیوند هیدروژنی بین کتیرا و سیلی‌مارین باشد. برهمکنش کتیرا با سیلی‌مارین در شبکه ژل کتیرا-پلی‌وینیل‌الکل نیز مشاهده شده است [۷].

با افزودن سیلی‌مارین به پروتئین دناتوره شده، به دلیل اثر پوشش‌دهندگی پیک‌های ایزوله پروتئین آب پنیر، پیک‌های سیلی-مارین ظاهر نشدند و تقریباً تمامی پیک‌های پروتئین بدون تغییر در عدد موجی در طیف مخلوط مشاهده شدند. در پژوهشی که برای تشکیل کمپلکس بتا-لاکتوگلوبولین با پلی‌فنل‌های چای سبز انجام شد، نشان داده شد که در کمپلکس نهایی پیک‌های مربوط به باندهای آمیدی I و II هیچ‌گونه جابه‌جایی نشان ندادند. از این رو پیشنهاد داده شد که پلی‌فنل‌های چای به‌واسطه برهمکنش‌های آبدوستی و آبریزی به تعدادی از آمینواسیدهای بتا-لاکتوگلوبولین متصل می‌شوند. نتایج مشابهی در مورد برهمکنش پلی‌فنل‌های چای با کازئین‌های شیر نیز گزارش شده است [۳۸].

با مقایسه طیف مادون قرمز ژل ترکیبی کتیرا-ایزوله پروتئین آب پنیر خالص و بارگذاری شده با سیلی‌مارین، مشاهده می‌گردد که افزودن سیلی‌مارین باند تازه‌ای در طیف ایجاد نکرد و فقط پیک‌های با عدد موجی ۳۲۶۱ و ۱۵۰۸ بر سانتی‌متر در ژل خالص به ۳۲۷۰ و به ۱۵۱۱ بر سانتی‌متر در ژل ترکیبی بارگذاری شده انتقال پیدا کردند که احتمالاً مبین ضعیف شدن پیوندهای هیدروژنی و الکترواستاتیک بین پروتئین و پلی‌ساکارید در ساختار ژل حاوی سیلی‌مارین باشد [۳۹، ۴۰].

۳-۵- ارزیابی نرخ تورم ساختارهای کرایوزل و زیروزل

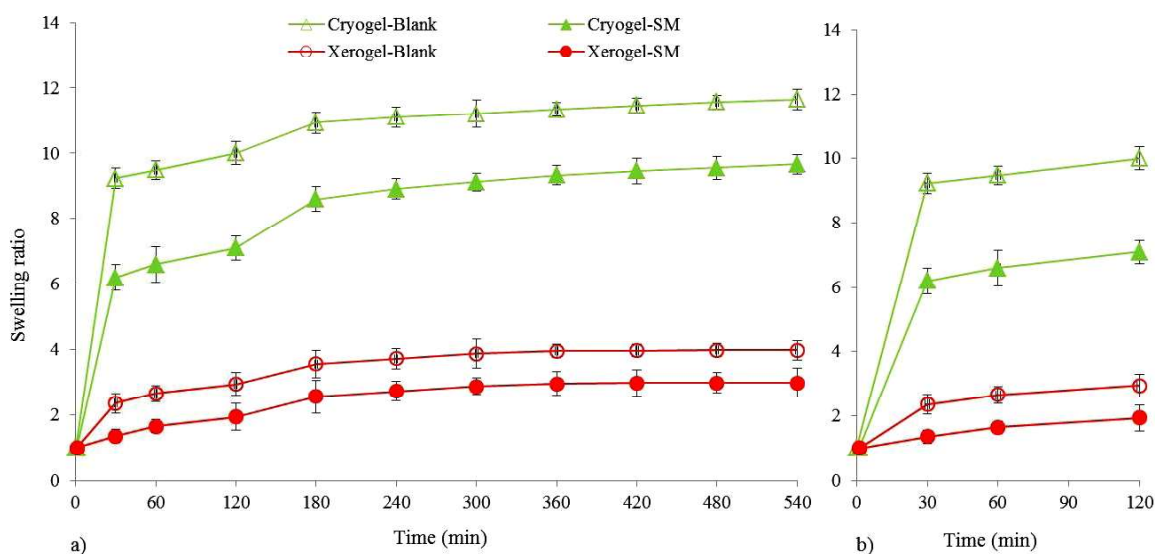
میزان تورم ژل‌های خشک شده به مدت ۲ ساعت در اسید کلریدریک و متعاقب آن در بافر فسفات در شکل (۳) نشان داده شده است. چنان‌که مشاهده می‌شود، نرخ تورم در محیط اسیدی پایین بود، درحالی‌که با انتقال ژل‌ها به محیط بافر فسفات و در نتیجه افزایش pH محیط، به میزان قابل ملاحظه‌ای زیاد شد.

ساختار ژل پروتئینی دناتوره شده متأثر از pH محیطی

افزودن پلی‌ساکارید به پروتئین و تشکیل ژل ترکیبی، احتمالاً با ایجاد تغییراتی در ساختار دوم پروتئین سبب جابجایی پیک‌ها می‌گردد. زمانی که پلی‌ساکارید به ژل پروتئینی افزوده شد، پیک‌های مربوط به آمید I و II پروتئین به ترتیب با اعداد موجی ۱۶۳۱ و ۱۵۰۴ با تغییرات اندک به اعداد موجی ۱۶۲۹ و ۱۵۱۱ بر سانتی‌متر انتقال پیدا کردند. کاهش عدد موجی در مورد ارتعاشات کششی مبین تغییر آرایش فضایی مولکول‌های پروتئین و قوی‌تر شدن پیوندهای هیدروژنی می‌باشد؛ درحالی‌که در مورد ارتعاشات خمشی باند آمید III با قوی‌تر شدن پیوندهای هیدروژنی، عدد موجی افزایش می‌یابد [۳۵، ۳۶]. به‌علاوه باند آمیدی III از عدد موجی ۱۲۲۸ به ۱۲۲۲ بر سانتی‌متر انتقال پیدا کرد و شدت آن نیز افزایش یافت. این نوع تغییر در عدد موجی باند آمیدی III مبین تغییر آرایش فضایی از نوع مارپیچ تصادفی و آلفا-هلیکس به ساختار منظم صفحات بتا می‌باشد [۳۷].

از سوی دیگر در طیف ژل مخلوط ایزوله پروتئین آب پنیر-کتیرا باند مربوط به کربوکسیلات کتیرا که در طیف کتیرای خالص در عدد موجی ۱۶۲۳ مشاهده شده بود، قابل ردیابی نبود که آن را احتمالاً بتوان به ظرفیت پایین پلی‌ساکاریدها برای تشکیل پیوند هیدروژنی بین زنجیری در حضور پروتئین و برهمکنش بین پروتئین و پلی‌ساکارید نسبت داد [۳۵]. با مقایسه طیف FTIR کتیرای خالص و ژل مخلوط مشاهده می‌گردد که باندهای با عدد موجی ۱۰۱۸، ۱۰۷۰ و ۱۱۵۵ بر سانتی‌متر در طیف کتیرا با انتقال به عدد موجی بالاتر در طیف ژل مخلوط، تیزتر نیز شده‌اند که این جابه‌جایی را احتمالاً می‌توان به منظم‌تر شدن آرایش فضایی ساکاریدی (تعداد آرایش‌های فضایی کم‌تر) نسبت داد.

لازم به ذکر است که در ژل ترکیبی، نسبت پلی‌ساکارید به پروتئین پایین بود، به‌همین دلیل پیک‌های ظاهر شده در طیف FTIR ژل ترکیبی عمدتاً مربوط به پروتئین بودند. مشاهدات مشابهی توسط سایر پژوهشگران نیز گزارش شده است [۳۷]. به منظور بررسی برهمکنش احتمالی بین سیلی‌مارین و کتیرا و نیز سیلی‌مارین با ایزوله پروتئین آب پنیر، طیف مادون قرمز کتیرا و پروتئین با و بدون سیلی‌مارین تهیه شدند. با افزودن سیلی‌مارین به کتیرا، در طیف ترکیبی، پیک‌های شاخص



شکل (۳) منحنی‌های تورم کرایوژل و زیروژل در اسید هیدروکلریک یک pH = ۱/۲ (۲ ساعت آغازین)، و بافر فسفات pH = ۷/۴ (۷ ساعت پایانی) در ۳۷ درجه سانتی‌گراد.

Fig. 3 Swelling ratio of pure and SM-loaded cryo- and xerogels in hydrochloric acid (pH 1.2, the first 2 h) and phosphate buffer (pH 7.4, the next 7 h) solutions at 37°C.

با نمونه خالص (جدول ۱)، تورم کم‌تری از خود نشان داد که احتمالاً مربوط به تاثیر سیلی‌مارین بر آبگریزی سطوح آن باشد که از مرطوب شدن سطح حفرات جلوگیری کرد.

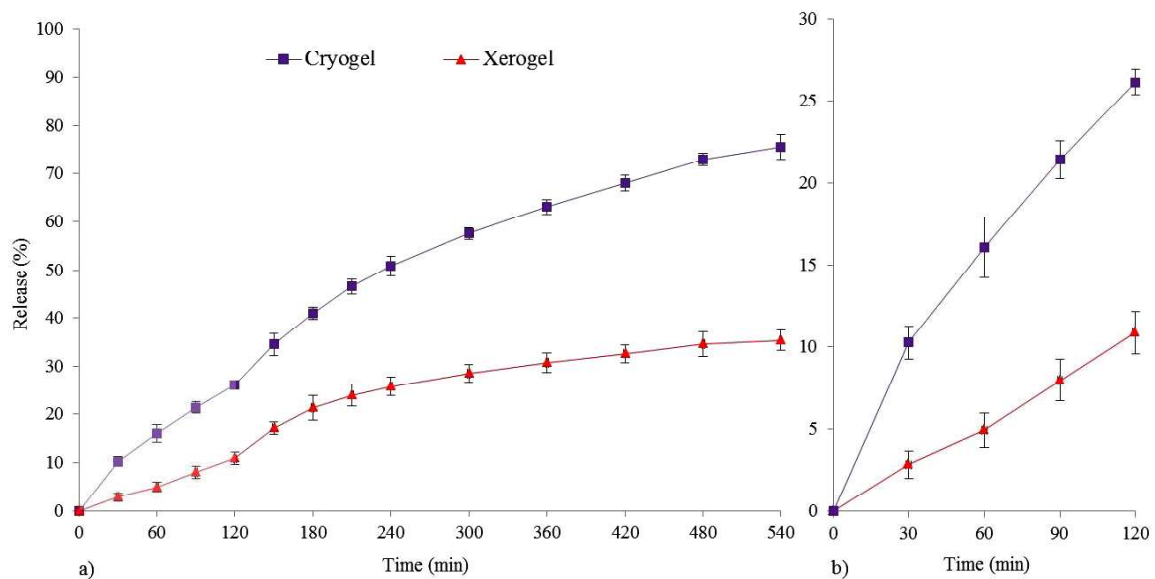
۳-۶- بررسی عوامل اثرگذار بر رهش سیلی‌مارین در شرایط اسیدی و بافر فسفات

همان طور که در شکل (۴) دیده می‌شود، آهنگ رهش سیلی‌مارین از ساختار زیروژل به کرایوژل روند افزایشی را نشان داد. در هر دو ساختار آهنگ رهش در شرایط شبیه سازی شده معده کم‌تر از محیط روده بود به طوری که بخش عمده سیلی‌مارین در شرایط شبیه سازی شده روده خارج شد. علت این تفاوت را می‌توان به تورم کم‌تر این ساختارهای ژلی در شرایط اسیدی نسبت داد. علاوه بر این تورم کم‌تر و در نتیجه، آهنگ رهش پایین‌تر سیلی‌مارین از زیروژل را می‌توان به ساختار بسیار چروکیده و غیر قابل نفوذ (پایین بودن حجم حفرات ماکرو و میکرو) آن مربوط دانست، درحالی‌که کرایوژل به دلیل دارا بودن حجم حفرات ماکرو بالاتر، سیلی‌مارین بیش‌تری را در ساعات اولیه آزاد کرد و این روند در محیط قلیایی نیز به همین ترتیب ادامه یافت (شکل ۴).

است که در آن حضور دارد. ژل‌های ایزوله پروتئین آب‌پنیر در مقادیر pH بالاتر و پایین‌تر از pH ایزوالکتریک باقیمانده‌های آمینواسیدی خود به ترتیب دارای بار منفی و مثبت هستند و دافعه الکترواستاتیک منجر به باز شدن ساختار آن‌ها می‌گردد [۴۱]. گاناسکاران و همکاران تورم هیدروژل‌های تولید شده از کنسانتره آب‌پنیر را در شرایط اسیدی و قلیایی بررسی نمودند و گزارش کردند که تورم در محیط اسیدی به مراتب کم‌تر از شرایط قلیایی بود و آن را به تعداد کم‌تر گروه‌های آمین در مقایسه با گروه‌های با بار منفی در زنجیرهای پروتئینی نسبت دادند [۴۲].

کرایوژل خالص بالاترین نرخ تورم را داشت که احتمالاً به ساختار بازتر آن و نفوذ بیشتر حلال به داخل شبکه پلیمری در مقایسه با زیروژل مربوط می‌شود.

بتز و همکاران نیز در بررسی تورم ایزوله پروتئین آب‌پنیر بیان نمودند که تورم ژل پروتئینی متاثر از چگالی اتصالات عرضی شبکه آن است، به طوری که هرچه قدر شبکه دارای اتصالات قوی‌تر باشد، نفوذ مولکول‌های آب به داخل آن سخت‌تر بوده و کم‌تر متورم می‌شود [۲۱]. کرایوژل حاوی سیلی‌مارین علیرغم دارا بودن حجم حفرات بالاتر در مقایسه



شکل (۴) (a) پروفایل رهش سیلی مارین از کرایوژل و زیروژل کتیرا-ایزوله پروتئین آب پنیر در شرایط شبیه سازی شده معده (دو ساعت اولیه) و روده (۷ ساعت بعد)، (b) ناحیه بزرگنمایی شده منحنی‌های رهش در ۲ ساعت اولیه.

Fig. 4 a) Release profiles of SM from gum tragacanth-WPI cryo- and xerogels in simulated gastric (SGF, the first 2 h) and intestinal (SIF, the next 7 h) at 37°C, b) zoomed-in region: the first 2 h of release in SGF.

۴- نتیجه گیری

در این مطالعه قابلیت بارگذاری سیلی مارین در ساختار کرایوژل و زیروژل فیزیکی کتیرا-ایزوله پروتئین آب پنیر به‌عنوان سامانه به دام اندازی و افزایش حلالیت این ترکیب فلاونوئیدی مورد بررسی قرار گرفت. کرایوژل و زیروژل ایزوله پروتئین آب پنیر ساختار بسیار ضعیف و شکننده‌ای داشت که با افزودن کتیرا خصوصیات ساختاری و مکانیکی آن بهبود یافت. افزودن سیلی مارین به ساختار، با ممانعت از نزدیک شدن پروتئین و پلی ساکارید سبب افزایش تخلخل آن گردید. به‌علاوه سیلی مارین بارگذاری شده در ساختارهای خشک، با آبگریز نمودن سطوح تورم آن‌ها را نسبت به نمونه‌های شاهد کاهش داد. براساس نتایج به‌دست آمده کرایوژل با داشتن ساختاری متخلخل و بالاتر بودن مساحت سطح ویژه می‌تواند به گونه‌ای کارآمد جهت به دام اندازی و افزایش حلالیت سیلی مارین و در نتیجه کنترل قند خون بیماران دیابتی مورد استفاده قرار گیرد. با این حال باید آزمایشات تکمیلی بالینی نیز بر روی این سامانه صورت پذیرد. در مقایسه با کرایوژل‌ها، زیروژل‌ها به دلیل دارا بودن ساختار فشرده و غیرقابل نفوذ و در نتیجه مساحت سطح ویژه پایین‌تر سیلی مارین کم‌تری را از خود آزاد نمودند.

خصوصیات مکانیکی ژل خشک نیز نرخ رهش ماده مؤثره را تحت تاثیر قرار می‌دهد [۴۳]، به‌طوری که هرچه قدر ساختار ژل استحکام بیشتری داشته باشد، نفوذ مولکول‌های آب به درون آن سخت‌تر و آهسته‌تر بوده و در نتیجه رهش ماده مؤثره با نرخ کم‌تری مواجه خواهد بود. زیروژل ایزوله پروتئین آب پنیر-کتیرا سختی بالاتر و استحکام بیشتری نسبت به کرایوژل داشت، که می‌تواند رهش سیلی مارین را تحت تاثیر قرار داده باشد.

برازش داده‌های رهش با مدل‌های ریاضی درجه صفر، درجه اول، هیگوشی و کورسمیر-پپاس و مقایسه پارامترهای R^2 ، RMSE و χ^2 نشان داد که الگوی رهش از ژل‌های خشک با مدل کورسمیر-پپاس تطابق بهتری داشت. مقادیر و ضرایب این مدل‌ها برای رهش سیلی مارین در شرایط اسیدی معده و قلیایی روده در جدول (۳) آورده شده است. مقادیر n برای زیروژل و کرایوژل کتیرا-ایزوله پروتئین آب پنیر بین ۰/۴۳ و ۰/۸۹ می‌باشد؛ بنابراین مکانیسم آزادسازی سیلی مارین غیر فیک است، و هر دو مکانیسم انتشار و فرسایش در رهش آن تاثیر دارند. به عبارت دیگر علاوه بر پدیده انتشار، باز شدن زنجیرهای پلیمر نیز بر مکانیسم آزادسازی تاثیر می‌گذارد.

جدول (۳) پارامترهای سینتیک رهش سیلی‌مارین از زیروژل و کرایوژل در شرایط شبیه سازی شده معده (SGF) و روده (SIF) و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد

Table 3 Kinetic parameters of SM release in simulated gastric (SGF) and intestinal (SIF) fluids from cryogels and xerogels at 37°C

کرایوژل Cryogel	زیروژل Xerogel	پارامتر مدل Model parameters	محیط رهش Release medium	
0.2348	0.0891	k	SDF	درجه صفر Xero order
0.9551	0.9967	R ²		
2.156	0.2442	RMSE		
4.6468	0.0596	χ ²	SIF	
0.1671	0.0807	k		
0.6689	0.5121	R ²		
9.597	5.524	RMSE	SDF	درجه یک First order
90.098	30.5181	χ ²		
0.0026	0.0009	k		
0.9764	0.9951	R ²	SIF	
1.564	0.2991	RMSE		
2.4459	0.0894	χ ²		
0.0027	0.001	k	SGF	هیگوجی Higuchi
0.9712	0.7435	R ²		
1.652	4.006	RMSE		
2.727	16.0452	χ ²	SIF	
2.236	0.8294	k		
0.9801	0.8853	R ²		
1.434	1.443	RMSE	SGF	کورسمیر - پیاس Korsemeier-Peppas
2.0575	2.0827	χ ²		
3.221	1.563	k		
0.9477	0.908	R ²	SIF	
3.812	2.398	RMSE		
14.534	5.752	χ ²		
0.9936	0.0722	k	SGF	
0.6826	1.046	n		
0.9999	0.9973	R ²		
0.1239	0.255	RMSE	SIF	
0.0153	0.0650	χ ²		
1.743	1.078	k		
0.6055	0.5638	n	SIF	
0.9902	0.9187	R ²		
2.821	2.392	RMSE		
7.950	5.7209	χ ²		

منابع

beads for albendazole delivery. *Pharm. Dev. Technol.*, 16(3), 228–36. [1] Wang, F.-Q., Li, P., Zhang, J.-P., Wang, A.-Q., Wei, Q. (2011). pH-sensitive magnetic alginate-chitosan

- Preparation of multiple emulsions based on thermodynamic incompatibility of heat-denatured whey protein and pectin solutions. *Food Hydrocolloids*, 20(5), 586–595.
- [12] Turgeon, S. L., Beaulieu, M. (2001). Improvement and modification of whey protein gel texture using polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 15(4), 583–591.
- [13] Bryant, C. M., McClements, D. J. (2000). Influence of xanthan gum on physical characteristics of heat-denatured whey protein solutions and gels. *Food Hydrocolloids*, 14(4), 383–390.
- [14] 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 Sci. Technol.*, 54(2), 336–345.
- [15] Dixit, N., Baboota, S., Kohli, K., Ahmad, S., Ali, J. (2007). Silymarin: A review of pharmacological aspects and bioavailability enhancement approaches. *Indian J. Pharmacol.*, 39(4), 172–179.
- [16] Grishechko, L. I., Amaral-Labat, G., Szczurek, A., Fierro, V., Kuznetsov, B. N., Celzard, A. (2013). Lignin-phenol-formaldehyde aerogels and cryogels. *Microporous Mesoporous Mater.*, 168, 19–29.
- [17] Müller, C. M. O., Yamashita, F., Laurindo, J. B. (2008). Evaluation of the effects of glycerol and sorbitol concentration and water activity on the water barrier properties of cassava starch films through a solubility approach. *Carbohydr. Polym.*, 72(1), 82–87.
- [18] Amaral-Labat, G., Szczurek, A., Fierro, V., Mason, E., Pizzi, A., Celzard, A. (2012). Impact of depressurizing rate on the porosity of aerogels. *Microporous Mesoporous Mater.*, 152, 240–245.
- [19] Swyngedau, S., Peleg, M. (1992). Characterization and prediction of the compressive stress-strain relationship of layered arrays of spongy baked goods. *Cereal Chem.*, 69, 217–221.
- [2] Norton, I. T., Frith, W. J. (2001). Microstructure design in mixed biopolymer composites. *Food Hydrocolloids*, 15(4), 543–553.
- [3] López-Franco, Y., Higuera-Ciapara, I., Goycoolea, F. M., Wang, W. (2009). Other exudates: tragacanth, karaya, mesquite gum and larchwood arabinogalactan. in: Philips, G.O., Williams, P.A. (Eds.), *Handbook of Hydrocolloids*, Woodhead publishing Ltd., New Delhi, pp 495–534.
- [4] Anderson, D. M. W., Grant, D. A. D. (1988). The chemical characterization of some Astragalus gum exudates. *Food Hydrocolloids*, 2(5), 417–423.
- [5] Ranjbar-Mohammadi, M., Bahrami, S. H., Joghataei, M. T. (2013). Fabrication of novel nanofiber scaffolds from gum tragacanth/poly(vinyl alcohol) for wound dressing application: In vitro evaluation and antibacterial properties. *Mater. Sci. Eng. C*, 33(8), 4935–4943.
- [6] Niknia, N., Kadkhodae, R. (2017). Factors affecting microstructure, physicochemical and textural properties of a novel Gum tragacanth-PVA blend cryogel. *Carbohydr. Polym.*, 475–482.
- [7] Niknia, N., Kadkhodae, R. (2017). Gum tragacanth-polyvinyl alcohol cryogel and xerogel blends for oral delivery of silymarin: Structural characterization and mucoadhesive property. *Carbohydr. Polym.*, 177, 315–323.
- [8] Bottomley, R., Evans, M., Parkinson, C. (1990). Whey proteins. in: Harris, P (Ed), *Food gels*, Elsevier Science Publisher Ltd., Essex, pp 435–466.
- [9] Hongsprabhas, P., Barbut, S. (1997). Ca²⁺-Induced cold gelation of whey protein isolate: effect of two-stage gelation. *Food Res. Int.*, 30(7), 523–527.
- [10] Duval, S., Chung, C., McClements, D. J. (2015). Protein-Polysaccharide Hydrogel Particles Formed by Biopolymer Phase Separation. *Food Biophys.*, 10(3), 334–341.
- [11] Kim, H., Decker, E., McClements, D.J. (2006).

- Whey protein aerogel as blended with cellulose crystalline particles or loaded with fish oil. *Food Chem.*, 196, 1016–1022.
- [30] Wu, Y., Chen, Z., Li, X., Li, M. (2009). Effect of tea polyphenols on the retrogradation of rice starch. *Food Res. Int.*, 42(2), 221–225.
- [31] Eugenia, C., Curran, G. (2017). Evaluation of Whey-protein-isolate edible films containing oregano (*Origanum vulgare*) essential oil to improve shelf life of cheeses during refrigerated storage. *J. Food Sci.*, 82, 1395–1401.
- [32] Blomfeldt, T. O. J., Olsson, R. T., Menon, M., Plackett, D., Johansson, E., Hedenqvist, M. S. (2010). Novel foams based on freeze-dried renewable vital wheat gluten. *Macromol. Mater. Eng.*, 295(9), 796–801.
- [33] Liu, L. S., Liu, C. K., Fishman, M. L., Hicks, K. B. (2007). Composite films from pectin and fish skin gelatin or soybean flour protein. *J. Agric. Food Chem.*, 55(6), 2349–2355.
- [34] Pranoto, Y., Lee, C. M., Park, H. J. (2007). Characterizations of fish gelatin films added with gellan and κ -carrageenan. *LWT Food Sci. Technol.*, 40(5), 766–774.
- [35] Guerrero, P., Kerry, J. P., De La Caba, K. (2014). FTIR characterization of protein-polysaccharide interactions in extruded blends. *Carbohydr. Polym.*, 111, 598–605.
- [36] Eissa, A. S., Puhl, C., Kadla, J. F., Khan, S. A. (2006). Enzymatic cross-linking of beta-lactoglobulin: conformational properties using FTIR spectroscopy. *Biomacromolecules*, 7(6), 1707–1713.
- [37] Timilsena, Y. P., Wang, B., Adhikari, R., Adhikari, B. (2015). Preparation and characterization of chia seed protein isolate-chia seed gum complex coacervates. *Food Hydrocolloids*, 52, 554–563.
- [38] Hasni, I., Bourassa, P., Hamdani, S., Samson, G., [20] Salvador, A., Varela, P., Sanz, T., Fiszman, S. M. (2009). Understanding potato chips crispy texture by simultaneous fracture and acoustic measurements, and sensory analysis. *LWT - Food Sci. Technol.*, 42(3), 763–767.
- [21] Betz, M., García-gonzález, C. A., Subrahmanyam, R. P., Smirnova, I., Kulozik, U. (2012). Preparation of novel whey protein-based aerogels as drug carriers for life science applications. *J. Supercrit. Fluids*, 72, 111–119.
- [22] Panapisal, V., Charoensri, S., Tantituvanont, A. (2012). Formulation of Microemulsion Systems for Dermal Delivery of Silymarin. *AAPS PharmSciTech*, 13(2), 389–399.
- [23] El-Sherbiny, I. M., Abdel-Mogib, M., Dawidar, A.-A. M., Elsayed, A., Smyth, H. D. C. (2011). Biodegradable pH-responsive alginate-poly (lactic-co-glycolic acid) nano/micro hydrogel matrices for oral delivery of silymarin. *Carbohydr. Polym.*, 83(3), 1345–1354.
- [24] Hadjiioannou, T. P., Christian, G. D., Koupparis, M. A., Macheras, P. E. (1993). *Quantitative Calculations in Pharmaceutical Practice and Research*. VCH Publishers Inc., New York, pp 345–348.
- [25] Bourne, D. W. A. (2002). Pharmacokinetics, in: Banker G.S, Rhodes, CT (Eds), *Modern Pharmaceutics*. 4th ed., Marcel Dekker Inc., New York, pp 67–92.
- [26] Higuchi, T. (1963). Mechanism of Sustained- Action Medication. *J. Pharm. Sci.*, 52(12), 1145–1149.
- [27] Jose, S., Fanguero, J. F., Smitha, J., Cinu, T. a., Chacko, a. J., Premaletha, K., Souto, E. B. (2013). Predictive modeling of insulin release profile from cross-linked chitosan microspheres. *Eur. J. Med. Chem.*, 60, 249–253.
- [28] Chen, H.-B., Wang, Y.-Z., Schiraldi, D. A. (2013). Foam-like materials based on whey protein isolate. *Eur. Polym. J.*, 49(10), 3387–3391.
- [29] Ahmadi, M., Madadlou, A., Saboury, A. A. (2016).

- Carpentier, R., Tajmir-Riahi, H.-A. (2011). Interaction of milk α - and β -caseins with tea polyphenols. *Food Chem.*, 126(2), 630–639.
- [39] Huang, G. Q., Sun, Y. T., Xiao, J. X., Yang, J. (2012). Complex coacervation of soybean protein isolate and chitosan. *Food Chem.*, 135(2), 534–539.
- [40] Espinosa-Andrews, H., Sandoval-Castilla, O., Vázquez-Torres, H., Vernon-Carter, E. J., Lobato-Calleros, C. (2010). Determination of the gum Arabic–chitosan interactions by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and characterization of the microstructure and rheological features of their coacervates. *Carbohydr. Polym.*, 79(3), 541–546.
- [41] O'Neill, G. J., Jacquier, J. C., Mukhopadhyaya, A., Egan, T., O'Sullivan, M., Sweeney, T., O'Riordan, E. D. (2015). In vitro and in vivo evaluation of whey protein hydrogels for oral delivery of riboflavin. *J. Funct. Foods*, 19, 512–521.
- [42] Gunasekaran, S., Xiao, L., Ould Eleya, M. M. (2006). Whey protein concentrate hydrogels as bioactive carriers. *J. Appl. Polym. Sci.*, 99(5), 2470–2476.
- [43] Selmer, I., Kleemann, C., Kulozik, U., Heinrich, S., Smirnova, I. (2015). Development of egg white protein aerogels as new matrix material for microencapsulation in food. *J. Supercrit. Fluids*, 106, 42–49.