



تأثیر نشاسته اکتیل سوکسینیک انیدرید بر خواص کف زایی کنسانتره پروتئین آب پنیر

محسن صهبایی اجلالی^۱، سید محمد علی رضوی^{۲*}

۱-کارشناس ارشد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران.

۲-استاد، قطب علمی هیدروکلوئیدهای طبیعی بومی ایران، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران.

| اطلاعات مقاله | چکیده |
|--|--|
| <p>تاریخ های مقاله :</p> <p>تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۰۶</p> <p>تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۳۰</p> | <p>در این مقاله، تأثیر برهمکنش بین کنسانتره پروتئین آب پنیر (WPC) و نشاسته اصلاح شده با اکتیل سوکسینیک انیدرید (OSAS) در محیط آبی به عنوان تابعی از pH (۳، ۴، ۵، ۶) و نسبت WPC به OSAS (۱:۲، ۱:۱ و ۲:۱) در غلظت کل ۱٪ وزنی/وزنی بر خواص کف (اندازه حباب، ظرفیت کف‌کنندگی و پایداری کف) مورد مطالعه قرار گرفت. اندازه حباب کوچک‌تر بیانگر پایداری بیشتر کف است. کم‌ترین اندازه حباب در نسبت ۱:۱ و pH=۴ مشاهده شد (۲۲۶/۵۲ میکرومتر) که اختلاف آماری معنی‌داری با اندازه حباب WPC شاهد در این pH داشت (۳۹۶/۱۵ میکرومتر). بیش‌ترین میزان کف‌کنندگی در نسبت ۱:۱ و pH=۳ مشاهده شد (۱۸۶/۳۳٪). بیش‌ترین میزان پایداری کف نیز در نسبت ۲:۱ و در pH=۴ بدست آمد (۸۳/۲۷٪) و اختلاف آماری معنی‌داری با نمونه شاهد (محلول WPC) داشت (p<۰/۰۵). نتایج این تحقیق نشان داد که برهمکنش‌های الکترواستاتیکی WPC و OSAS می‌توانند به عنوان روشی موثر در جهت بهبود خواص کف‌کنندگی و پایداری کف WPC در غلظت‌های پایین مورد استفاده قرار گیرند.</p> |
| <p>کلمات کلیدی:</p> <p>پایداری کف، کمپلکس الکترواستاتیک، کنسانتره پروتئین آب پنیر، نشاسته اصلاح شده.</p> <p>DOI: 10.22034/FSCT.19.130.61 DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.130.6.5</p> <p>* مسئول مکاتبات: s.razavi@um.ac.ir</p> | |

۱- مقدمه

کف سیستم کلئیدی است که بر مبنای آگومریزاسیون فاز پراکنده (گاز) در یک فاز پیوسته (آب) تشکیل می‌شود. پروتئین‌ها که ماکرومولکول‌های آمفی‌فیلیک هستند، به عنوان عامل ایجاد کف مورد استفاده قرار می‌گیرند. آن‌ها قادرند تا گسترده شوند و در سطح مشترک بین فاز پراکنده و فاز پیوسته قرار گیرند و یک لایه جذب شده ویسکوالاستیک را تشکیل دهند. در محصولات غذایی، وجود گاز به صورت کف و یا شبکه اسفنجی از اهمیت کاربردی زیادی برخوردار است، زیرا بر پارامترهایی همچون ظاهر، بافت، قوام، قابلیت هضم، اندازه، دانسیته و خصوصیات ارگانولپتیکی و در نتیجه بر قابلیت پذیرش تاثیر می‌گذارند [۱]. مطالعات دهه اخیر نشان داده است که کمپلکس الکترواستاتیک پروتئین-پلی‌ساکارید به طرز چشمگیری ویژگی‌های کف‌کنندگی پروتئین‌ها را نسبت به حالتی که از پروتئین به تنهایی استفاده می‌شود، بهبود می‌بخشد. به نظر می‌رسد این کمپلکس نوعی سورفکتانت بزرگ است، که بخش هیدروفیل توسط پلی‌ساکاریدها و بخش هیدروفوب توسط پروتئین تشکیل می‌شود. یکی از دلایلی که علاقه کمی در مورد مطالعه ویژگی‌های بین سطحی و کف‌کنندگی پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها مطرح می‌شود، طبیعت غیر تعادلی سیستم است [۲].

ویژگی‌های عملکردی پروتئین‌های غذایی در ترکیب با پلی‌ساکاریدها به سه گروه تقسیم‌بندی می‌گردد. الف) ویژگی‌های ژل‌دهندگی یا تجمع‌پذیری (ب) ویژگی‌های جذب آب (خیس‌شوندگی، تورم، حلالیت، ویسکوزیته، ظرفیت نگهداری آب، دگرچسبی ج) ویژگی‌های سطحی و بین سطحی مثل کف‌کنندگی و امولسیون‌کنندگی [۳]. امروزه کمپلکس‌های پروتئین-پلی‌ساکارید به طور گسترده در صنایع غذایی و سایر صنایع استفاده می‌شود. مهمترین موارد استفاده از این کمپلکس‌ها عبارتند از: جایگزین‌های چربی، میکروکپسولاسیون و رهایش کنترل شده ترکیبات زیست‌فعال، تثبیت آنزیم، بهبود پایداری محصولات لبنی و فیلم‌های خوراکی [۴-۵].

پروتئین‌های آب‌پنیر به عنوان ماده اولیه با ارزش در فرمولاسیون محصولات غذایی به دلیل ویژگی‌های عملکردی، تغذیه‌ای و سلامتی بخش مطلوب بسیار مورد استفاده قرار می‌گیرد [۶-۷]. پروتئین‌های آب‌پنیر به دو صورت کنسانتره

(WPC)^۱ و ایزوله (WPI)^۲ نسبت به سایر منابع پروتئینی مانند کازئین‌ها ارزان‌تر [۸] و هضم و جذب بالاتری دارند [۹]. ویژگی‌های کف‌کنندگی WPI و WPC موضوع تحقیقات بسیاری بوده است. پروتئین‌های آب‌پنیر خاصیت کف‌کنندگی مناسبی دارد که به آن اجازه می‌دهد که پتانسیل جایگزینی با پروتئین سفیده تخم‌مرغ را داشته باشد. اگرچه عدم پایداری، علی‌الخصوص در طی پخت، استفاده از آن را به عنوان یک عامل کف‌کننده محدود می‌کند. فاکتورهایی که بر ویژگی‌های کف‌کنندگی پروتئین آب‌پنیر اثر می‌گذارند، شامل فاکتورهای داخلی مثل انعطاف‌پذیری مولکولیو شرایط محیطی مثل pH، قدرت یونی و شرایط حرارتی و سایر ترکیبات موجود در محیط هستند [۱].

نشاسته در شکل طبیعی خود هیدروفیل است، بنابراین بر روی سطح بین هوا-آب جذب نمی‌شود. اصلاح هیدروفوب نشاسته بطرق مختلف برای مثال از طریق افزودن اکتیل سوکسینیک انیدرید (OSA)^۳ انجام می‌شود. نشاسته اصلاح‌شده با اکتیل سوکسینیک انیدرید (OSAS) یک امولسیفایر بیوپلیمری آمفی‌فیلیکارزان قیمت است. بخش انتهایی هیدروفوب آن می‌تواند بر روی فاز روغنی جذب شده و گروه‌های هیدروفیل آن بر روی فاز آبی جذب می‌شوند و با کاهش کشش سطحی منجر به پایداری امولسیون‌ها و کفها می‌شود [۱۰]. OSAS به دلیل پایداری در برابر درجه حرارت بالا و در گستره وسیعی از pH و قدرت یونی مورد توجه قرار گرفته است [۸]. فرآیند جایگذاری OSA در کربن ۲، ۳ و ۶ در مولکول گلوکز اتفاق می‌افتد. بنابراین محققان، گروه‌های OSA در بخش آمورف مولکول‌های آمیلوپکتین در داخل نشاسته و همچنین روی سطح گرانول‌ها نیز وجود دارند. از آنجایی که زنجیره جانبی در OSAS دارای اسیدهای کربوکسیلیک می‌باشند، OSAS به عنوان پلی‌الکترولیت باردار فعال سطحی که به طور ضعیفی دارای بار منفی است، شناخته شده است. نتایج تحقیقات محققان نشان داد که OSAS دارای فعالیت سطحی و کشش سطحی مشابه با پروتئین آب‌پنیر به علت ماهیت آمفی‌فیلیک آن است [۱۱]. OSAS به طور گسترده در صنایع غذایی به عنوان امولسیفایر و عامل انکپسوله کننده مورد استفاده قرار گرفته است [۱۲].

1. Whey protein concentrate
2. Whey protein isolate
3. Octenylsuccinic anhydride

اسیدکلریدریک یا سود به مقادیر مشخص ۳، ۴، ۵ و ۶ با استفاده از pH متر (Canaway-SAT 401) رسانده شد [۳، ۴، ۱۲].

۲-۳- اندازه گیری ظرفیت کف کنندگی و

پایداری کف

به منظور بررسی خواص کف‌زایی محلول مخلوط WPC و OSAS و همچنین محلول WPC (به عنوان نمونه شاهد)، ابتدا محلول‌های فوق در pH و غلظت مشخص تهیه گردید. سپس با استفاده از هموژنایزر اولترا تراکس (T25، شرکت IKA، ساخت کشور آلمان) با ۱۰۰۰۰ rpm، به مدت ۲ دقیقه همزده شدند. اورران یا همان افزایش حجم محاسبه شده و تحت عنوان ظرفیت کف‌کنندگی و میزان کاهش حجم کف نیز پس از ۳۰ دقیقه طبق معادلات زیر به عنوان شاخص پایداری کف گزارش گردید [۱۴].

$$\text{ظرفیت کف کنندگی} = \frac{\text{حجم کف}}{\text{حجم سوسپانسیون اولیه}} \times 100$$

$$\text{پایداری کف} = \frac{\text{ارتفاع کف پس از 30 دقیقه}}{\text{ارتفاع اولیه کف}} \times 100$$

۲-۴- آنالیز اندازه حساب ها

تصویربرداری از نمونه های کف توسط دوربین دینو لایت پلاس (مدل AM313T، ساخت کشور تایوان) انجام شد. تجزیه تحلیل تصاویر با استفاده از نرم افزار ImageJ نسخه ۱/۵۲، ۶۴ بیتی برای توصیف ریز ساختار کف و تعیین قطر متوسط حساب‌ها در pH و نسبت‌های مدنظر انجام شد. نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در جای ثابتی قرار گرفتند و سپس عکس‌برداری از سطح نمونه‌های کف در دمای محیط (۲۵ درجه سلسیوس) انجام گرفت [۱۵].

۲-۵- تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری نتایج در قالب طرح فاکتوریل کاملاً تصادفی، دو تیمار pH (در چهار سطح) و نسبت WPC به OSAS (در سه سطح) و در سه تکرار انجام گردید. آنالیز واریانس ANOVA و مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن در سطح معنی‌داری ۹۵ درصد در نرم افزار SPSS22 انجام شد. نمودارها با استفاده از نرم افزار 14 Sigmaplot ترسیم شدند.

برای فرمولاسیون کف پایدار بر مبنای مخلوط بیوپلیمرها (پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها) ضروری است تا اثر برهمکنش آن‌ها در محیط‌های آبی را درک کرد تا ساختار و ترکیب آن‌ها را در بین سطح و ویژگی‌های کف‌کنندگی و سیستم‌های کلئیدی مورد بررسی قرار داد [۱۳]. از آنجایی که پایداری کف حاصل از WPC ضعیف است، فرض براین است که OSAS از طریق تشکیل کمپلکس با WPC، ویژگی‌های پایداری کف پروتئین‌های آب پنیر را بهبود می‌بخشد. از اینرو هدف تحقیق حاضر بررسی خواص کف‌زایی کمپلکس OSAS-WPC در محیط آبی (در غلظت کل ۱٪ وزنی/وزنی) به عنوان تابعی از نسبت WPC به OSAS (۱:۲، ۱:۳، ۱:۴، ۱:۵ و ۱:۶) از طریق آنالیز داده‌های اندازه حساب، ظرفیت کف‌کنندگی و پایداری کف بوده است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

مواد این پژوهش شامل OSAS (HICAP100، سدیم اکتینیل‌سوکسینات) از شرکت Ingredion، (هامبورگ آلمان)، WPC ۸۰ درصد از شرکت میلی (آلمان) و هیدروکلریک اسید با خلوص ۳۷٪ و سود از شرکت مرک (آلمان) تهیه گردید.

۲-۲- روش آماده‌سازی محلول‌ها

پودرهای WPC و OSAS توسط ترازوی آزمایشگاهی با دقت ۰/۰۱ گرم توزین شدند. محلول‌های استوک OSAS و WPC از انحلال پودرها در آب دیونیزه تهیه گردید و پس از همزدن به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شبانه روز قرار گرفت تا به طور کامل هیدراته شود. از سدیم آزید ۰/۰۲٪ وزنی/وزنی به محلول در جهت جلوگیری از رشد میکروبی استفاده گردید. از اسیدکلریدریک و سود برای تنظیم pH قبل از آزمایش استفاده شد [۱، ۱۲].

مقادیر مشخص از WPC و OSAS با انتخاب حجم مناسب از محلول استوک WPC و OSAS و در نسبت‌های ۱:۱، ۱:۲ و ۲:۱ WPC به OSAS روی یک همزن با دور ۳۰۰ rpm با یکدیگر مخلوط شد تا به غلظت نهایی ۱٪ وزنی/وزنی برسد، سپس pH محلول را با استفاده از محلول‌های

۳- نتایج و بحث

۳-۱- اندازه حباب ها

افزایش حجم و پایداری کف بستگی به مورفولوژی حباب‌های کف مثل اندازه حباب، توزیع اندازه و دانسیته حباب‌ها دارد. بر طبق نتایج آنالیز واریانس، اثر pH بر اندازه حباب‌ها معنی‌دار بود ($p < 0.05$). با توجه به جدول ۱ می‌توان دریافت در نسبت ثابت ۱:۱، با کاهش pH از ۶ تا ۵، اندازه حباب‌ها از ۴۱۱/۶۶ میکرومتر به ۳۳۷/۶۴ میکرومتر کاهش یافت و با کاهش pH تا ۴، این عدد به ۲۲۶/۵۲ میکرومتر رسید ولی در pH برابر ۳، اندازه حباب‌ها عدد بزرگتری (۲۸۳/۷۴ میکرومتر) را نشان داد. نتایج بیانگر آن است که در هر نسبت مشخص، کم‌ترین اندازه حباب در pH=۴ و بیش‌ترین اندازه حباب در pH=۶ مشاهده گردید. در pH=۳، جایی که تعادل الکترواستاتیک حاصل نمی‌شود، WPC و OSAS با یکدیگر برهمکنش داده و تشکیل یک لایه‌ی فیلم ثانویه را در سطح هوا-آب می‌دهند. در این شرایط، اندازه حباب پس از ۳۰ دقیقه، نسبت به زمانی که به تنهایی از WPC استفاده می‌شود، کمتر است و اختلاف آماری معنی‌داری با WPC شاهد در تمام pH‌های مورد مطالعه وجود دارد ($p < 0.05$). اندازه حباب‌ها در pH=۴ در مقایسه با pH=۳ کوچک‌تر است، زیرا اگرچه پتانسیل‌زتا در pH=۳ نسبت به pH=۴ بالاتر است، اما ویسکوزیته پایین‌تر نسبت به pH=۴ باعث می‌شود تا مکانیسم‌های افزایش اندازه حباب تاثیر بیش‌تری بر این pH بگذارند. اختلاف آماری معنی‌داری بین این دو pH در تمام نسبت‌ها وجود داشت

($p < 0.05$). در pH=۳ به دلیل این که ذرات ریزتر هستند به میزان کافی در فضای بین سطحی قرار می‌گیرند و همچنین پتانسیل‌زتا بالاتر مانع نزدیک شدن حباب‌ها به یکدیگر می‌گردد، بنابراین اندازه حباب‌ها پس از ۳۰ دقیقه مقدار کوچک‌تری را نسبت به pH=۵ از خود نشان می‌دهد، در pH برابر ۵ به دلیل این که اندازه ذرات کمپلکس بزرگ‌تر و بار الکتریکی آن‌ها کوچک‌تر بود، فرصت جهت‌گیری کافی را نداشته و بنابراین علی‌رغم ویسکوزیته بالاتر در این pH در مقایسه با pH=۳، پس از ۳۰ دقیقه اندازه حباب‌ها نسبت به pH=۳ بیش‌تر بود، بنابراین و اختلاف آماری معنی‌داری در اندازه حباب بین این دو pH در تمام نسبت‌های مورد مطالعه وجود داشت ($p < 0.05$) [۱۳]. در pH برابر ۶ به دلیل آن که فرآیند کمپلکس به صورت محدود رخ می‌دهد، بنابراین پدیده تشکیل فیلم دو لایه در فضای بین سطحی به میزان بسیار اندکی اتفاق می‌افتد، و با گذشت زمان اندازه حباب‌ها، بیش‌ترین مقدار خواهد شد ($p < 0.05$).

در محلول شاهد WPC در pH برابر ۳، پتانسیل‌زتا بسیار بالای WPC شاهد و ویسکوزیته کم باعث شد که مکانیسم‌های ناپایداری کف با شدت بیش‌تری رخ داده و باعث ناپایداری کف پس از ۳۰ دقیقه گردد. اندازه حباب‌ها به دلیل ناپایدار بودن کف صفر گزارش شد. در pH برابر ۶ نیز به دلیل ویسکوزیته کم WPC، کف پایداری خود را پس از ۳۰ دقیقه از دست داد و به علت عدم وجود حباب، عکسبرداری انجام نگرفت و مقدار اندازه حباب صفر گزارش شد (جدول ۱).

Table 1 Bubbles size of WPC solution and WPC-OSAS complex at 1% concentration (w/w)

| OSAS:WPC ratio | pH | Bubble siz (μm) |
|----------------|----|--------------------------------|
| 1:2 | 3 | 324.71 \pm 6.50 ^e |
| 1:2 | 4 | 265.86 \pm 4.72 ^j |
| 1:2 | 5 | 377.46 \pm 6.55 ^d |
| 1:2 | 6 | 442.18 \pm 4.58 ^a |
| 1:1 | 3 | 283.74 \pm 6.02 ^l |
| 1:1 | 4 | 226.52 \pm 5.56 ^l |
| 1:1 | 5 | 337.64 \pm 4.58 ^f |
| 1:1 | 6 | 411.66 \pm 4.54 ^b |
| 2:1 | 3 | 315.21 \pm 6.04 ^h |
| 2:1 | 4 | 254.41 \pm 4.50 ^k |
| 2:1 | 5 | 360.83 \pm 4.04 ^c |
| 2:1 | 6 | 394.32 \pm 9.16 ^c |
| WPC | 3 | 0.00 \pm 0.00 ^m |
| | 4 | 396.15 \pm 6.55 ^c |
| | 5 | 443.33 \pm 6.11 ^a |
| | 6 | 0.00 \pm 0.00 ^m |

مطابق نتایج آنالیز واریانس، اثر نسبت دو بیوپلیمر بر اندازه حباب‌ها پس از گذشت ۳۰ دقیقه معنی‌دار بود ($p < 0/05$). همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، در pH های ۳، ۴ و ۵، بین نسبت‌های مختلف، پایین‌ترین اندازه حباب در نسبت ۱:۱ در مقایسه با سایر نسبت‌ها مشاهده شد و نشان‌دهنده آن است که برهمکنش‌های الکترواستاتیکی تأثیر مهمی بر روند تغییرات اندازه حباب در نسبت‌های مختلف WPC به OSAS دارند، با بررسی اندازه حباب پس از ۳۰ دقیقه در pH ثابت ۶، مشاهده می‌شود در نسبت ۲:۱ WPC به OSAS در مقایسه با نسبت ۱:۱، اندازه حباب کوچک‌تر بود و اختلاف آماری معنی‌داری بین این دو نسبت در این pH وجود داشت ($p < 0/05$)، که احتمالاً به علت محدود بودن برهمکنش‌های الکترواستاتیکی بین WPC و OSAS در این pH است، در سایر pH ها به دلیل تشکیل کمپلکس‌های الکترواستاتیکی، کم‌ترین اندازه حباب در نسبت ۱:۱ مشاهده شد. خلوصی و همکاران (۱۳۹۹) اندازه حباب ۱۷۱/۸۲ میکرومتر را برای کمپلکس WPC-صمغ دانه شاهی در نسبت ۱:۵، غلظت کل ۰/۳٪ وزنی/وزنی و pH=۳ گزارش کردند و برای WPC شاهد در این pH، به دلیل آن که پایداری خود را از دست داده بود، عدد صفر را گزارش نمودند. اندازه حباب‌ها در pH=۴/۵، ۳۰۴/۷۱ میکرومتر بود. بیشینه برهمکنش کمپلکس‌ها بین WPC-صمغ دانه شاهی در pH=۳ مشاهده شد [۱۴]. فونج‌دینگ و همکاران (۲۰۰۲) اندازه حباب‌های کمپلکس WPI را در غلظت کل ۱۰٪ وزنی/حجمی در pH=۷ با جایگذاری پروتئین سفیده تخم مرغ با WPI از ۰ تا ۷۵٪ به ترتیب حدود ۱۳۸ میکرومتر در غلظت ۰٪ پروتئین سفیده تخم مرغ و حدود ۱۰۰ میکرومتر برای پروتئین سفیده تخم مرغ با جایگذاری ۷۵٪ گزارش نمودند که تأثیر جایگذاری ترکیب پلی‌ساکاریدی یا پروتئینی بر اندازه حباب را به خوبی مشخص می‌کند [۱۶].

مطابق نتایج آنالیز واریانس، اثر توامان pH و نسبت دو بیوپلیمر بر اندازه حباب‌ها پس از گذشت ۳۰ دقیقه معنی‌دار بود ($p < 0/05$). با توجه به جدول ۱، با کاهش pH از ۶ به ۴ اندازه حباب کاهش یافت. با در نظر گرفتن تأثیر نسبت، با کاهش نسبت WPC به OSAS تا نسبت ۱:۱، میزان اندازه حباب کاهش می‌یابد. اگرچه در pH=۶ در نسبت ۲:۱ WPC به OSAS مقدار اندازه حباب در مقایسه با نسبت ۱:۱

کوچک‌تر است، اما کاهش بیش‌تر نسبت تا ۲:۱ WPC به OSAS به همراه کاهش pH تا ۴، منجر به کاهش اندازه حباب‌ها پس از ۳۰ دقیقه شد.

۳-۲- ظرفیت کف‌کنندگی و پایداری کف

بر طبق نتایج آنالیز واریانس، اثر pH بر ظرفیت کف‌کنندگی و پایداری کف محلول WPC و WPC-OSAS معنی‌دار بود ($p < 0/05$). نتایج ارائه شده در شکل ۱ نشان می‌دهد بیش‌ترین میزان کف‌کنندگی برای نسبت ۱:۱ در pH=۳ مشاهده شد (۱۸۶/۳۳٪). اندازه ذرات کوچک‌تر، پتانسیل‌زتای بیش‌تر و ویسکوزیته پایین‌تر نسبت به pH های ۴ و ۵ از دلایل ممکن برای این نتیجه است. با توجه به شکل ۱ در نسبت های ۱:۲ و ۲:۱ نیز بیش‌ترین میزان کف‌کنندگی در pH=۳ حاصل شد. در pH برابر ۶، نتایج ظرفیت کف‌کنندگی بیانگر آن بود که برهمکنش‌های الکترواستاتیکی محدودی بین WPC و OSAS شکل گرفته است. میزان کف‌کنندگی در نسبت ۱:۱ و pH=۶ برابر ۱۵۹/۳۳٪ بود که در مقایسه با WPC شاهد در این pH (۱۵۱/۶۶٪) بیشتر بود ($p < 0/05$). رقابت بین WPC و OSAS برای جذب در سطح مشترک در این pH وجود داشت که می‌تواند منجر به کاهش ظرفیت کف‌کنندگی گردد [۱۳]. OSAS به تنهایی قابلیت فعالیت سطحی بالایی ندارد و علاوه بر این، از قرار گرفتن مولکول‌های WPC در سطح ممانعت می‌کند، اما با تشکیل کمپلکس بین WPC و OSAS فرآیند انتقال آن به فضای بین سطح تسهیل شده، بنابراین در نقاط مورد مطالعه از آنجایی که کمپلکس به صورت محدودی اتفاق می‌افتد، این فرآیند میسر نشده و بنابراین نیروی آب-پوشی مولکول‌های OSAS بر نیروی بین‌سطحی غلبه می‌کند. مطابق شکل ۱، در pH=۳ و نسبت ۱:۱، میزان کف-کنندگی (۱۸۶/۳۳٪) اختلاف آماری معنی‌داری با WPC (۱۴۴/۳۳٪) داشت ($p < 0/05$).

اثر نسبت WPC به OSAS بر خواص کف‌کنندگی مطابق نتایج آنالیز واریانس معنی‌دار بود ($p < 0/05$). با بررسی روند کلی ظرفیت کف‌کنندگی در pH های مختلف می‌توان به این نتیجه رسید که بیش‌ترین ظرفیت کف‌کنندگی در نسبت ۱:۱ WPC به OSAS وجود دارد که این خود بیانگر بیشینه‌ی برهمکنش‌های الکترواستاتیکی است. مطابق شکل ۱، مقدار کف‌کنندگی در pH=۴ و در نسبت ۱:۲ برابر ۱۵۶/۶۶٪، در نسبت ۱:۱ برابر ۱۶۷/۶۶٪ و در نسبت ۲:۱ حدود ۱۶۳/۶۶٪

کمتر و اندازه ذرات بزرگتر، کوآسروات نامحلول تشکیل شده و منجر به کاهش ظرفیت کف‌کنندگی در $\text{pH}=5$ در هر نسبت اندازه‌گیری شده در مقایسه با $\text{pH}=3$ شد. اگرچه کف‌کنندگی بیش‌تری نسبت به $\text{pH}=6$ مشاهده شد که بیانگر تاثیر برهمکنش‌های الکترواستاتیکی بر ظرفیت کف‌کنندگی است. در $\text{pH}=4$ در هر نسبت دو بیوپلیمر، کم‌ترین میزان ظرفیت کف‌کنندگی در مقایسه با pH های 3 و 5 مشاهده شد. با مشاهده شکل 2، میزان کف‌کنندگی برای نسبت 1:1 برابر $167/66\%$ است که به علت اندازه ذرات بزرگ‌تر کمپلکس در این نمونه است که مانع نفوذ ذرات بزرگ در فضای بین‌سطحی می‌گردد [18، 4].

با مقایسه پایداری کف این نسبت با محلول WPC شاهد در $\text{pH}=4$ ($163/66\%$) اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده شد، که بیانگر تاثیر OSAS بر میزان کف‌کنندگی WPC بود ($p < 0.05$). در $\text{pH}=4$ ، برهمکنش‌های الکترواستاتیکی بین بیوپلیمرها در سطح به دلیل سازگاری ترمودینامیکی اتفاق می‌افتد. WPC به سطح فاز پراکنده جذب می‌شود و توسط OSAS پوشش‌دهی می‌شود و مولکول‌های OSAS مولکول‌های قطبی در فاز پیوسته واکنش می‌دهند. این لایه ثانویه که در اطراف سطح هوا-آب شکل می‌گیرد، از ادغام حباب‌ها به یکدیگر جلوگیری می‌کند. در این pH WPC به صورت جزئی دچار بازشدن تاخوردگی‌ها شده و گروه‌های هیدروفوب بیش‌تری در معرض قرار می‌گیرند، بنابراین انعطاف‌پذیری و خواص آلفی‌فیلک افزایش می‌یابد و موجب بهبود پایداری کف می‌شود [13]. در این pH برآیند نتایج پتانسیل‌زتا و ویسکوزیته بالا شرایط مطلوبی را برای پایداری کف بوجود آورد، از اینرو اختلاف آماری معنی‌داری بین پایداری کف در $\text{pH}=4$ در هر نسبت اندازه‌گیری شده با سایر نقاط وجود دارد ($p < 0.05$). بالاترین میزان پایداری کف در $\text{pH}=4$ و در نسبت $\text{WPC}:1$ به OSAS مشاهده شد ($183/27\%$) که در مقایسه با پایداری کف WPC ($50/74\%$)، اختلاف آماری معنی‌داری را از خود نشان داد ($p < 0.05$). نتایج فوق به خوبی نقش OSAS را بر افزایش میزان پایداری کف ثابت می‌کند (شکل 2).

بود ($p < 0.05$). در مورد سایر pH ها هم چنین روندی مشاهده شد. علی‌رغم ویسکوزیته پایین‌تر و بار الکتریکی بالاتر در نسبت 1:2 در مقایسه با نسبت 2:1 و انتظار کف‌کنندگی بالاتر محلول در نسبت 1:2، به دلیل اندازه ذرات بزرگ‌تر در این نسبت، کف‌کنندگی برای نسبت 2:1 در pH های 3، 4 و 5 بیش‌تر از نسبت 1:2 بود ($p < 0.05$) [13].

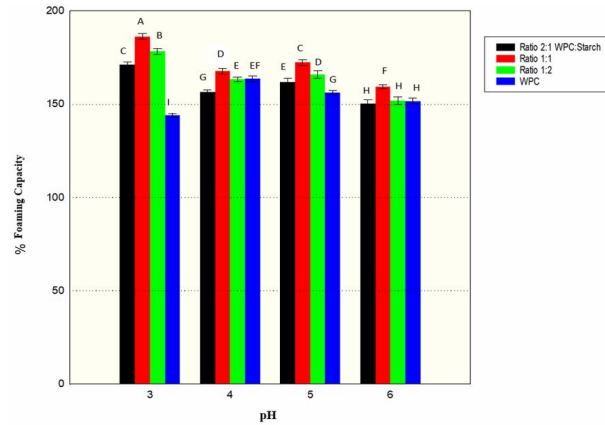


Fig 1 Faoming capacity of WPC and OSAS at 1% total concentration (w/w) as a function of pH and biopolymers ratio

در شکل 2 نتایج پایداری کف WPC و کمپلکس‌های OSAS-WPC در pH ها و نسبت‌های مختلف ارائه شده است. کمترین پایداری کف ($35/11\%$) در بین محلول‌های کمپلکس در نسبت 1:2 و pH معادل 6 مشاهده شد و اختلاف آماری با سایر نمونه‌ها معنی‌دار بود ($p < 0.05$). پایداری کف در pH برابر با 6 و نسبت 2:1 برابر $48/29\%$ بود. اگرچه در $\text{pH}=6$ کف حاصل از محلول WPC پایداری خود را از دست داد که ممکن است به دلیل ویسکوزیته پایین محلول باشد که قابلیت حفظ و پایداری کف را ندارد. نیروهای دافعه الکترواستاتیکی منجر به کاهش پایداری کف در $\text{pH}=6$ می‌شود، زیرا منجر به عدم تشکیل یک لایه فیلم با استحکام و پایداری مناسب در سطح هوا-آب می‌گردد.

وجود OSAS اضافی نیز منجر به جلوگیری از تشکیل یک لایه فیلم مترکم پروتئینی می‌گردد [17]. در $\text{pH}=5$ ، میزان کف‌کنندگی محلول WPC در مقایسه با $\text{pH}=4$ کاهش یافت که احتمالاً به دلیل نزدیکی به نقطه ایزوالکتریک WPC و حلالیت پایین آن پایین‌تر بوده است (میانگین $163/66\%$ در $\text{pH}=4$ و $156/33\%$ در $\text{pH}=5$). در مورد مخلوط WPC-OSAS نیز در pH برابر 5 به دلیل بار الکتریکی

از آنجایی که خواص پایداری کف تحت تاثیر دو عامل ویژگی‌های رئولوژیکی و الکتروکنتیکی محلول است، پایداری بیش‌تر کف در نسبت ۲:۱ در مقایسه با نسبت ۱:۲ نشانگر غلبه عامل ویسکوزیته بر بار الکتریکی محلول کمپلکس برای ایجاد پایداری است، علاوه بر این اندازه ذرات کوچک‌تر کمپلکس در نسبت ۲:۱ نیز بر پایداری بیش‌تر کمپلکس در این نسبت موثر است. اختلاف آماری معنی‌داری بین پایداری کف نسبت‌های ۲:۱ و ۱:۱ در $pH=4$ وجود نداشت، بنابراین می‌توان اثر نسبت در این pH مشابه $pH=3$ در تمام نسبت‌ها معنی‌دار نبوده است ($p>0.05$)، بدین معناست که امکان جایگزینی WPC با OSAS در جهت استحصال کف با پایداری مناسب وجود دارد. در این نقاط برآیند نیروهای ویسکوز و الکتریکی در حالت تعادلی قرار می‌گیرد و به نظر دو عامل تاثیر یکسان و خلاف یکدیگر را اعمال می‌کنند که منجر به مشاهده کف‌هایی با پایداری تقریباً یکسان می‌گردد [۱].

ژو و همکاران (۲۰۱۹) اثر pH و نسبت را بر خواص کف‌کنندگی WPC و سدیم آلزینات در غلظت کل ۱٪ وزنی/وزنی و نسبت ۰/۱ تا ۳۲ WPC به سدیم آلزینات و در pH های ۰/۵، ۴ و ۷ بررسی کرده و گزارش نمودند که نسبت‌های مختلف WPC به سدیم آلزینات تاثیر معنی‌داری بر ظرفیت کف‌کنندگی در مقایسه با WPC شاهد ندارد. در نسبت ۱:۱ و $pH=4$ پایداری کف به میزان ۵۰٪ نسبت به WPC شاهد افزایش یافت [۴]. در پژوهشی دیگر اثر کمپلکس‌های الکترواستاتیکی بین WPC (در غلظت ۸٪ وزنی/وزنی) و پکتین و گوار (غلظت ۰ تا ۱٪ وزنی/وزنی) در $pH=4/5$ مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که با افزایش غلظت ترکیبات پلی‌ساکاریدی میزان کف‌کنندگی تا ۷۳٪ نسبت به WPC شاهد کاهش یافت، اگرچه میزان پایداری کف از ۴۳٪ در WPC شاهد تا ۸۰٪ در محلول‌های کمپلکس افزایش یافت [۳]. چان و همکاران (۲۰۱۴) میزان کف‌کنندگی و پایداری کف WPI (در دو سطح غلظت ۲ و ۶٪ وزنی/وزنی و هیدروکسی پروپیل متیل سلولز در غلظت ۰/۲۵٪ وزنی/وزنی را مورد بررسی قرار دادند [۲۰]. میزان کف‌کنندگی از ۱۵۱/۵٪ برای WPI ۲٪ به ۱۱۴/۵٪ کاهش یافت. در مورد WPI ۶٪ نیز کف‌کنندگی از ۱۲۵٪ تا ۱۱۳/۵٪ کاهش یافت. میزان پایداری کف کمپلکس WPI-هیدروکسی پروپیل متیل سلولز

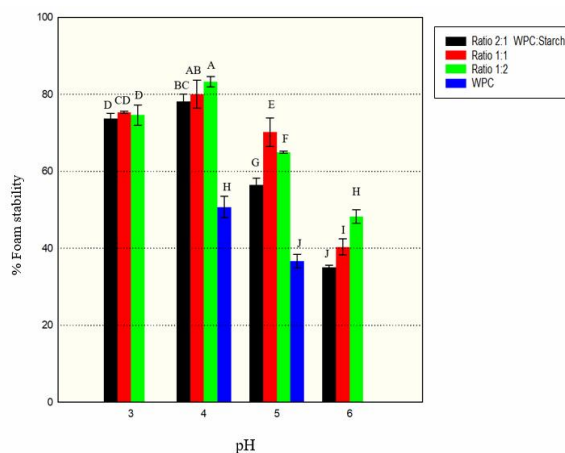


Fig 2 Faomingstability of WPC and OSAS at 1% total concentration (w/w) as a function of pH and biopolymers ratio

با توجه به شکل ۲، پایداری کف در $pH=3$ در مقایسه با $pH=5$ در هر نسبت دو بیوپلیمر بیشتر است. به عنوان مثال پایداری کف در نسبت ۱:۱ و $pH=5$ برابر ۱۶٪/۷۰٪ می‌باشد که در مقایسه با ۷۴/۹۷٪ در $pH=3$ اختلاف آماری معنی‌داری داشته است ($p<0.05$). بنظر می‌رسد علیرغم ویسکوزیته‌ی بیش‌تر در $pH=5$ ، به دلیل بار الکتریکی بالاتر کمپلکس در $pH=3$ ، دافعه الکترواستاتیک از آب‌اندازی حباب‌های کف جلوگیری کرده و تاثیر بیش‌تری بر پایداری کف گذاشته است. دلیل مهم دیگر، تقویت لایه‌ی کف تشکیل شده از طریق جذب و برهمکنش ذرات OSAS بر روی آن می‌باشد. ذرات کوچک جذب‌شده، تشکیل پوششی با ساختار منسجم را می‌دهند که از ادغام حباب‌ها از طریق دافعه استریک یا الکترواستاتیک کوآسروا مانعت به عمل می‌آورد. در مقایسه با WPC شاهد در $pH=3$ که کف حاصل پس از ۳۰ دقیقه پایداری خود را به طور کامل از دست داد، می‌توان نقش OSAS را بر پایداری کف در این pH بخوبی مشاهده کرد. دلایل احتمالی ممکن برای ناپایداری کف حاصل از محلول WPC شاهد در $pH=3$ می‌تواند در ارتباط با ویسکوزیته کم محلول در این pH و هم‌چنین بار الکتریکی بسیار بالای محلول WPC باشد که موجب ناپایداری کف می‌گردد [۱۹].

با بررسی اثر نسبت دو بیوپلیمر بر پایداری کف در $pH=4$ این نتیجه حاصل شد که میزان پایداری در نسبت ۲:۱ (۲۷/۸۳٪) در مقایسه با نسبت ۱:۲ (۱۰/۷۸٪) بطور معنی‌داری بیش‌تر است ($p<0.05$). اگرچه پتانسیل‌زتای سامانه در نسبت ۱:۲ در این pH در مقایسه با نسبت ۲:۱ بالاتر است اما میزان ویسکوزیته در نسبت ۲:۱ در مقایسه با نسبت ۱:۲ بیشتر است.

به میزان ۰.۵٪ در مقایسه با WPI شاهد ۲٪ وزنی/وزنی و به میزان ۰.۷٪ در مقایسه با WPI شاهد ۶٪ وزنی/وزنی افزایش یافت. کورپاتوا و همکاران (۲۰۰۹) خواص کف‌کنندگی WPC- پروتئین سفیده تخم‌مرغ در pHهای ۵، ۷ و ۹ و نسبت‌های ۱:۲، ۱:۱ و ۲:۱ و در غلظت کل ۶۰ گرم بر لیتر مورد بررسی قرار دادند [۲۱]. در نسبت ۲:۱ WPC به پروتئین سفیده تخم‌مرغ بیش‌ترین مقدار کف‌کنندگی در pH=۴ مشاهده شد. میزان کف‌کنندگی در این نسبت و pH به میزان ۴۵٪ نسبت به WPC شاهد افزایش یافت و میزان آب‌اندازی نیز به مقدار ۲۰٪ در مقایسه با WPC شاهد کاهش یافت. خلوصی و همکاران (۲۰۲۱) پایداری کف WPC را در محلول ۰.۳٪ وزنی/وزنی و نسبت ۱:۵ WPC به صمغ دانه شاهی بررسی نمودند [۱۴]. در pHهای ۴/۵ و ۶ اختلاف آماری در پایداری کف مشاهده نشد، اما در pH معادل ۳ که بیشینه برهمکنش گزارش شده بود، میزان پایداری کف به ۸۸/۷۰٪ در مقایسه با پایداری صفر برای محلول WPC شاهد رسید. با مقایسه نتایج تحقیق حاضر با تحقیقات قبلی می‌توان نتیجه گرفت که کمپلکس WPC-OSAS علاوه بر حفظ و ارتقای قابلیت کف‌کنندگی WPC، منجر به افزایش پایداری کف در تمام سطوح pH می‌گردد.

این تحقیق با هدف بررسی اثر pH و نسبت WPC به OSAS بر خواص کف زایی WPC انجام گرفت. یافته‌های این تحقیق نشان داد کف نمونه شاهد (WPC) در pHهای ۳ و ۶ پس از گذشت ۳۰ دقیقه کاملاً ناپایدار شد و بنابراین اندازه حباب کف مربوطه صفر گزارش شد، اما در مورد WPC در pHهای ۴ و ۵، کف‌ها پایداری اندکی از خود نشان دادند که اندازه حباب‌های بزرگ‌تر نسبت به محلول‌های کمپلکس، پس از گذشت ۳۰ دقیقه نتایج فوق را تایید کرد. پایین‌ترین اندازه حباب در نسبت ۱:۱ WPC به OSAS و در pH برابر با ۴ مشاهده شد. میزان ظرفیت کف‌کنندگی و پایداری کف کمپلکس OSAS-WPC به طرز معنی‌داری در مقایسه با WPC شاهد افزایش یافت. بالاترین میزان کف‌کنندگی در تمام نسبت‌های مورد مشاهده برای نسبت ۱:۱ و در pH برابر ۳ مشاهده شد، که به دلیل اندازه ذرات کوچک‌تر کمپلکس است که موجب می‌شود ذرات کمپلکس با سرعت بیش‌تری در فضای بین سطحی هوا-آب قرار بگیرند. همچنین ویسکوزیته کم‌تر سیستم امکان انتقال و جابه‌جایی سریع و فرارگیری آن‌ها در سطح فاز بین هوا-آب را تسهیل می‌کند. اگرچه بیش‌ترین پایداری کف در pH برابر با ۴ و در نسبت‌های ۱:۱ و نسبت ۲:۱ مشاهده شد که به دلیل برآیند دو عامل ویسکوزیته و بار الکتریکی بالاتر بود. نتایج پژوهش حاضر بیانگر آن است که برهمکنش الکترواستاتیک WPC با بر خواص عملکردی (اندازه حباب، خاصیت کف‌کنندگی و پایداری کف) WPC موثر است، بنابراین می‌توان از نشاسته اصلاح شده OSAS در جهت بهبود خواص کف‌کنندگی WPC در غلظت‌های کم‌تر از ۱٪ و در دامنه‌ی وسیعی از pH استفاده کرد.

۴- نتیجه گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که کمپلکس WPC-OSAS با افزایش نسبت WPC به OSAS، پایداری کف و ظرفیت کف‌کنندگی آن افزایش می‌یابد. همچنین، کاهش pH و افزایش نسبت WPC به OSAS منجر به بهبود پایداری کف می‌گردد.

نتایج آنالیز واریانس نشان داد اثر متقابل pH و نسبت دو پلیمر بر ظرفیت کف‌کنندگی و پایداری کف معنی دار است ($p < 0.05$). مطابق شکل ۲، کاهش pH از ۶ به ۳، منجر

optimization of ultrasound-assisted curcumin nanoemulsions stabilized by OSA-modified starch. *Ultrasonics - Sonochemistry*, 21(4), 1265–1274.

- [9] Séverin, S., & Wen-shui, X. I. A. (2006). Nutritional evaluation of caseins and whey proteins and their hydrolysates from Protamex. *Journal of Zhejiang University Science B*, 7(2), 90–98.
- [10] Li, L., Xiao, N., Li, M., & Xie, X. (2018). Physical Properties of Oil-in-Water Nanoemulsions Stabilized by OSA-modified Starch for the Encapsulation of Lycopene. *Colloids and Surfaces A*, 552(1), 59–66.
- [11] Torres, O., Murray, B., & Sarkar, A. (2016). Emulsion microgel particles: Novel encapsulation strategy for lipophilic molecules. *Trends in Food Science & Technology*, 55(1), 98–108.
- [12] Wu, B., & Macclements, J. D. (2015). Microgels formed by electrostatic complexation of gelatin and OSA starch: Potential fat or starch mimetics. *Food Hydrocolloids*, 47(1), 87–93.
- [13] Sadahira, M. S., Rezende, F. C., Rodrigues, M. I., Yamada, A. T., Cunha, R. L., & Netto, F. M. (2015). Effect of pH and interaction between egg white protein and hydroxypropylmethylcellulose in bulk aqueous medium on foaming properties. *Carbohydrate Polymers*, 125(1), 26–34.
- [14] Khoolosi, Z., Mazaheri Tehrani, M. and Razavi, S.M.A., (2021), Optimization of the interaction of whey protein concentrate-cress seed gum using response surface methodology (RSM) and investigating the foaming properties of the optimal sample, *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 17(4), 70, 437-449.
- [15] Kelvin, Lord. (2017). Bubble size measurements and foam test methods. (R. J. Pugh, Ed.) (1st ed.). Nottingham Trent University: Cambridge University Press.
- [16] Foegeding, E.A., Davis, J.P., Doucet, D., McGuffey, M., (2002). Advances in modifying and understanding whey protein functionally. *Food Science and Technology*. 13:151- 159.
- [17] Ganzevles, R. A., Kosters, H., Vliet, T. Van, Stuart, M. A. C., & Jongh, H. H. J. De. (2007). Polysaccharide Charge Density Regulating Protein Adsorption to Air / Water Interfaces by Protein / Polysaccharide Complex Formation. *American Chemical Society*, 111(45), 12969–12976.

۵- تقدیر و تشکر

از حمایت های دانشگاه فردوسی مشهد (گرنه شماره ۵۲۰۴۴) و صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (گرنه ۹۶۰۱۵۵۴۰) در انجام این طرح پژوهشی سپاسگزاری می شود.

۶- منابع

- [1] Wang, Z., Zhang, S., & Vardhanabhuti, B. (2015). Foaming Properties of Whey Protein Isolate and λ -Carrageenan Mixed Systems. *Journal of Food Science*, 80(8), 1893–1902.
- [2] Schmitt, C., Sanchez, C., Desobry-banon, S., Hardy, J., Schmitt, C., Sanchez, C., Hardy, J. (1998). Structure and Technofunctional Properties of Protein-Polysaccharide Complexes: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(8), 689–753.
- [3] Oduse, K., Campbell, L., Lonchamp, J., & Euston, S. R. (2018). Electrostatic complexes of whey protein and pectin as foaming and emulsifying agents. *International Journal of Food Properties*, 20(3), 3027–3041.
- [4] Zhao, Y., Khalid, N., Shu, G., Neves, M. A., Kobayashi, I., & Nakajima, M. (2018). Complex coacervates from gelatin and octenyl succinic anhydride modi fi ed kudzu starch: Insights of formulation and characterization. *Food Hydrocolloids*, 86(1), 70–77.
- [5] Wijaya, W., Patel, A., Setiowati, A., Meeren, P. (2017). Functional colloids from proteins and polysaccharides for food applications. *Trends in Food Science & Technology*, 68(1), 56–69.
- [6] Firebaugh, J. D., Daubert, C. R., Firebaugh, J. D., & Daubert, C. R. (2007). Emulsifying and Foaming Properties of a derivatized whey protein ingredient of a derivatized whey protein ingredient. *International Journal of Food Properties*, 8(1), 243–253.
- [7] Hou, P., Pu, F., Zou, H., Diao, M., Zhao, C., & Xi, C. (2019). Whey protein stabilized nanoemulsion: A potential delivery system for ginsenoside Rg3 whey protein stabilized nanoemulsion: Potential Rg3 delivery system. *Food Bioscience*, 31(1), 1–8.
- [8] Abbas, S., Bashari, M., Akhtar, W., Wei, W., & Zhang, X. (2014). Process

- [20] Chun, J., Hong, G., Surassmo, S., Weiss, J., Min, S., & Choi, M. (2014). Study of the phase separation behaviour of native or preheated WPI with polysaccharides. *Polymer*, 55(16), 4379–4384.
- [21] Kuropatwa, M., Tolkach, A., & Kulozik, U. (2009). Impact of pH on the interactions between whey and egg white proteins as assessed by the foamability of their mixtures. *Food Hydrocolloids*, 23(8), 2174–2181.
- [18] Perez, A., Carrara, C. R., Sa, C. C., & Rodri, J. M. (2010). Interfacial and Foaming Characteristics of Milk Whey Protein and Polysaccharide Mixed Systems. *American Institute of Chemical Engineers*, 56(4), 1107–1117.
- [19] Huo, W., Zhang, X., Gan, K., Chen, Y., Xu, J., & Yang, J. (2018). Effect of Zeta Potential on Properties of Foamed Colloidal Suspension. *Journal of the European Ceramic Society*, 39(2), 1–37.



Scientific Research

Effect of octenyl succinic anhydride starch on foaming properties of whey protein concentrate

Sahbaei Ejlali, M. ¹, Razavi, S. M. A. ^{2*}

1. M.Sc., Department of Food Science & Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

2. Professor, Center of Excellence in Native Natural Hydrocolloids of Iran, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

ABSTRACT

In this study, the effect of the interaction between WPC and OSAS in aqueous solution (at total biopolymer concentration 1% w/w) as function of pH (3, 4, 5, 6) and ratio (1:2, 1:1 and 2:1) on the foaming properties (bubble size, foaming capacity and foam stability) was investigated. Smaller bubbles size showed more foam stability. Lowest bubbles size was observed at 1:1 and pH 4 (226.52 μm) and statistical difference between pure WPC (396.15 μm) and WPC-OSAS complex solutions at this pH was significant. Maximum foaming capacity was observed at ratio 1:1 and pH 3 (%186.33) and maximum foam stability was calculated at 1:2 WPC: OSAS and pH 4 (%83.27) and there was significant statistical difference with control sample (WPC solution) (%50.74). This research showed that electrostatic interaction between WPC and OSAS can be used as an effective method for improving foaming capacity and foam stability of WPC at low concentrations.

ARTICLE INFO

Article History:

Received 2022/ 04/ 26

Accepted 2022/ 09/ 21

Keywords:

Foaming stability,
Electrostatic complex,
Whey Protein Concentrate,
Modified starch.

DOI: 10.22034/FSCT.19.130.61

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.130.6.5

*Corresponding Author E-Mail:
s.razavi@um.ac.ir