

تعیین خصوصیات کمپلکس سه گانه‌ی ژلاتین- موسیلاژ بزرک (*Linum usitatissimum*) - تانیک اسید اکسید

فرزانه محسنی^۱، سید امیر حسین گلی^{۲*}، مریم عبداللهی^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و مهندسی صنایع غذایی، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران.

۲- دانشیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- دانشجوی دکتری علوم و مهندسی صنایع غذایی، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۹/۰۲/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۶/۰۱)

چکیده

در این مطالعه، کمپلکس سه گانه‌ی موسیلاژ بزرک (FM)-ژلاتین-تانیک اسید اکسید (OTA) در دو شرایط اسیدی و قلیایی تهیه شد. میزان کل زیست پلیمرها و میزان تانیک اسید اکسید اضافه شده به ترتیب ۲٪ (وزنی/وزنی) و ۵٪ (غلظت کل زیست پلیمرها) بود. طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه و اسپکتروفوتومتری جامد جهت تایید تشکیل کمپلکس، حجم، حلالیت و محتوای فنولیک کمپلکس انجام شد. سپس، تاثیر غلظت تانیک اسید اکسید شده (۰/۵، ۲/۵، ۵ و ۱۰٪) و دمای واکنش ژلاتین با تانیک اسید اکسید شده (۳۰، ۴۰ و ۵۰ درجه سلسیوس) با کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، راندمان کمپلکس و رنگ سنجی اندازه گیری شد. مشخص شد که افزودن تانیک اسید اکسید شده به محلول ژلاتین در pH قلیایی پیوندهای قوی و یک کمپلکس پایدار ایجاد می‌کند. حلالیت آبی کمپلکس اسیدی (۶۱ درصد) بالاتر از نمونه قلیایی (۳/۶ درصد) بود. شرایط بهینه، مرتبط با محتوای فنولیک بالا و حلالیت کم، ۵ درصد تانیک اسید اکسید و دمای واکنش ۳۰ درجه سلسیوس بود. این کمپلکس می‌تواند برای کاربردهای مختلفی از جمله محافظت از مواد غذایی حساس در برابر اکسیداسیون و رهایش کنترل شده ترکیبات زیست فعال در سیستم‌های تحویل در صنایع غذایی مناسب باشد.

کلید واژگان: تانیک اسید اکسید، موسیلاژ بزرک، ژلاتین، کمپلکس سه گانه، اسپکتروسکوپی فرابنفش-مرئی سطح جامد

۱- مقدمه

پروتئین‌ها و پلی ساکاریدها پلیمرهای طبیعی هستند که می‌توانند به طور همزمان در صنایع غذایی مورد استفاده قرار گیرند و دارای خصوصیات عملکردی مانند پایدار کنندگی امولسیون‌ها و کف‌ها، تغلیظ کنندگی محلول‌ها و تشکیل ژل‌ها هستند [۱]. از طرف دیگر، ترکیبات فنولیک متابولیت‌های ثانویه در گیاهان هستند که به عنوان ضد میکروب، آنتی اکسیدان و جلوگیری کننده از سرطان و بیماری‌های قلبی عروقی شناخته می‌شوند [۲]. پس از برقراری کمپلکس بین پروتئین‌ها، پلی ساکاریدها و پلی فنول‌ها، ویژگی‌ها و عملکردهای فیزیوشیمیایی منحصر به فردی نمایان می‌شود [۱]. این کمپلکس سه گانه می‌تواند حلالیت، پایداری حرارتی، خاصیت امولسیون کنندگی و عملکرد انتقال را بهبود بخشد و فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین، پلی ساکارید و ترکیب فنولی موجود در محصولات غذایی را افزایش دهد [۱، ۳، ۴ و ۵].

کمپلکس سه گانه ی پروتئین- پلی ساکارید- پلی فنول می‌تواند به دو صورت برگشت پذیر و برگشت ناپذیر تشکیل شود [۲]. پیوندهای کووالانسی از نوع برگشت ناپذیر بدلیل ایجاد تغییرات قوی و دائمی بهتر از سایر پیوندها هستند [۶]. در هر دو شرایط اسیدی و قلیایی می‌توان اتصالات کووالانسی بین ترکیبات فنولی و پروتئین ایجاد کرد. در مطالعه‌ای که توسط انواری و همکاران (۲۰۱۶) انجام شده است، محلول تانیک اسید اکسید (OTA) به توده مرکب صمغ عربی- ژلاتین در pH اسیدی اضافه شد و تأثیر آن روی خواص رئولوژیکی ژل مورد بررسی قرار گرفت [۸]. به طور مشابه، موهوزا و همکاران (۲۰۱۹) توده مرکب ژلاتین و پکتین با درجه متوکسیل بالا تهیه کرده و افزودن تانیک اسید بر روی خصوصیات رئولوژیکی و حرارتی این مجموعه را ارزیابی کردند. آن‌ها اظهار داشتند که افزودن تانیک اسید به توده مرکب منجر به برهمکنش درون مولکولی بیشتر و به دنبال آن باعث بهبود مقاومت ژل و خصوصیات حرارتی این مجموعه می‌شود [۹]. در پژوهشی دیگر، پیوند بین ژلاتین و محلول تانیک اسید اکسید از طریق برهمکنش‌های کووالانسی و غیر

کووالانسی و فعالیت آنتی اکسیدانی و خاصیت امولسیون کنندگی ژلاتین اصلاح شده ارزیابی شد [۱۰]. اتصالات بین پروتئین- پلی ساکارید- پلی فنول می‌تواند به هر دو روش آنزیمی و غیر آنزیمی شامل استفاده از رادیکال آزاد، واکنش در شرایط قلیایی، واکنش‌های میلارد و الکترواستاتیک برقرار شود [۱۱].

واکنش‌های الکترواستاتیک ساده‌ترین و کنترل کننده‌ترین روش برای تشکیل کمپلکس‌های سه گانه است. واکنش‌های جاذبه الکترواستاتیک غالباً بین دو زیست پلیمر با بار مخالف اتفاق می‌افتد و سبب تشکیل کمپلکس می‌شود که می‌تواند بسته به خواص زیست پلیمرها و حلال، pH و شرایط مخلوط کردن، یک یا دو فاز باشد [۱۲ و ۱۳]. گلیسرول و تانیک اسید در تهیه توده مرکب پروتئین شیر و کربوکسی متیل سلولز به منظور ریزپوشانی β -پینن، به عنوان یک ماده طعم دهنده، استفاده شدند. نتایج نشان داد که راندمان توده مرکب می‌تواند با افزودن گلیسرول یا تانیک اسید تحت تأثیر قرار گیرد، به طوری که گلیسرول به دلیل ساختار همبسته اثر بهتری نسبت به تانیک اسید نشان می‌دهد [۱۴]. در یک مطالعه دیگر، میکروسفرهای توده مرکب تولید شده از ژلاتین- صمغ عربی- تانیک اسید برای رهایش کنترل شده آلیل ایزوتیوسیانات بررسی شده است. برای این منظور، ژلاتین از طریق برهمکنش‌های الکترواستاتیک در pH اسیدی به صمغ عربی پیوند داده شد و سپس تانیک اسید نیز با گروه‌های باقی مانده روی سطح توده مرکب اتصال داده شد [۱۵]. علاوه بر این، توده مرکب ژلاتین- پکتین با درجه متوکسیل بالا اتصال عرضی داده شده با تانیک اسید در pH اسیدی، راندمان ریزپوشانی بالا (۷۵/۴٪) و بهبود پایداری حرارتی روغن نعنای را از حدود ۱۷۵ درجه سلسیوس به ۲۷۵ درجه سلسیوس نشان داد [۹].

ژلاتین، زیست پلیمر مشتق شده از کلاژن، یک پروتئین آمفوتریک است که نقطه ایزوالکتریک آن به ماده مورد استفاده و روش تولید ژلاتین بستگی دارد [۱۶ و ۱۷]. ژلاتین، در pH بالاتر از نقطه ایزوالکتریک، بار منفی دارد در حالی که در دامنه پایین‌تر از نقطه ایزوالکتریک دارای بار مثبت است. ژلاتین به طور گسترده‌ای در

سیگما آلدریج تهیه شدند.

۲-۲- استخراج موسیلاژ بزرک (FM)

استخراج موسیلاژ بزرک طبق روش حداد و همکاران در سال ۲۰۱۸ انجام گرفت [۲۱]. دانه‌های بوجاری و تمیز شده به نسبت ۱ به ۱۳ (وزنی/حجمی) با آب دیونیزه مخلوط و سپس در انکوباتور شیکردار (آیکا^۱ مدل KS 4000i، آلمان) در دمای ۸۰ درجه سلسیوس با دور ۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲ ساعت همزده شدند. در ادامه، دانه‌ها از محلول موسیلاژ توسط الک با مش ۴۰ جدا شدند. به محلول موسیلاژ به نسبت ۱ به ۳ اتانول ۹۶٪ اضافه گردید و رسوب موسیلاژ بزرک حاصل توسط الک با مش ۶۰ جدا و پس از حلال زدایی در آن ۶۵ درجه سلسیوس به مدت ۴ ساعت، در دستگاه خشک کن انجمادی (دنا وکیوم مدل FD-5003-BT، ایران) خشک شد و پودر حاصل در دمای ۴ درجه سلسیوس نگه داری شد.

۲-۳- تهیه کمپلکس سه گانه

۲-۳-۱- تهیه محلول‌های ژلاتین، موسیلاژ بزرک و تانیک اسید اکسید

محلول ژلاتین طبق روش پنا و همکاران (۲۰۱۰) تهیه شد [۲۲]. محلول موسیلاژ بزرک طبق روش کائوشیک و همکاران (۲۰۱۵) و با اندکی تغییرات تهیه شد [۱۹]. ۱ گرم پودر موسیلاژ توزین شده و به آن ۵۰ میلی لیتر آب دیونیزه اضافه شد. سپس به مدت یک ساعت در دمای ۵۰ درجه سلسیوس همراه با همزدن محلول تهیه شد. برای هیدراته شدن کامل موسیلاژ، محلول به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سلسیوس قرار گرفت. برای تهیه محلول تانیک اسید اکسید، ۲/۵ گرم پودر تانیک اسید در ۱۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه در دمای محیط به مدت ۳۰ دقیقه همزده شد. سپس، pH محلول تانیک اسید توسط محلول سود ۱ نرمال بر روی ۹ تنظیم شد و به مدت ۲ ساعت جهت تبدیل تانیک اسید به کینون و تولید تانیک اسید اکسید تحت گاز اکسیژن قرار گرفت [۸].

۲-۳-۲- تشکیل کمپلکس

کمپلکس سه گانه در pH اسیدی طبق روش انوری

تشکیل کمپلکس با دیگر زیست پلیمرها مورد استفاده قرار می‌گیرد [۱۶]. موسیلاژ بزرک (FM)، هیدروکلوئید طبیعی استخراج شده از دانه، یک پلی ساکارید آنیونی است که از D-زایلوز، L-آرابینوز، L-رامنوز، L-گالاکتوز، D-گلوکز و L-گالاکتورونیک اسید تشکیل شده است [۱۸]. با توجه به بار منفی این زیست پلیمر در pHهای مختلف، قادر است با سایر زیست پلیمرها کمپلکس توده مرکب را تشکیل دهد. کائوشیک و همکاران (۲۰۱۵) یک توده مرکب با استفاده از پروتئین بزرک دارای بار مثبت و موسیلاژ بزرک دارای بار منفی در pH برابر ۳/۱ ایجاد کردند [۱۹]. تانیک اسید یک پلی فنول گیاهی است که از یک گلوکز مرکزی که با ۹-۱۰ گروه اسید گالیک واکنش داده است، تشکیل شده است [۱۴]. با توجه به وجود گروه‌های مختلف فنول در ساختار آن، تانیک اسید به عنوان ماده اتصال دهنده عرضی شناخته شده و قادر به برقراری پیوند از طریق پیوندهای هیدروژنی، برهمکنش‌های آبگریز و پیوندهای کووالانسی با سایر اجزاء است [۲۰].

هدف از پژوهش حاضر، ساختن کمپلکس سه گانه و ارزیابی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آن بود. بنابراین، در مرحله اول، کمپلکس سه گانه موسیلاژ بزرک-ژلاتین-تانیک اسید اکسید در دو pH اسیدی و قلیایی تولید و خصوصیات کمپلکس با استفاده از طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه، اسپکتروفوتومتری جامد، اندازه گیری حجم، حلالیت و محتوای فنولی بررسی شد. اثر غلظت‌های مختلف تانیک اسید اکسید و همچنین دمای واکنش ژلاتین و تانیک اسید اکسید بر ویژگی‌های کمپلکس نیز مورد بررسی قرار گرفت.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

دانه‌ی بزرک قهوه‌ای و روغن بزرک از بازار محلی خریداری شد. ژلاتین گاوی، نوع اسیدی (B) با بلوم ۱۸۰ از شرکت بهین آزما (شیراز، ایران) و تانیک اسید (C₇₆H₅₂O₄₆) از شرکت سیگما آلدریج تهیه شد. سایر مواد شیمیایی با درجه آزمایشگاهی از شرکت مرک و

نگه داری شد.

۲-۳-۳- تاثیر شرایط واکنش بر خصوصیات

کمپلکس

در این بخش، اثر غلظت‌های مختلف تانیک اسید اکسید (۰/۵، ۲/۵، ۵ و ۱۰ درصد غلظت کل زیست پلیمرها) و همچنین دمای واکنش ژلاتین- تانیک اسید اکسید (۳۰، ۴۰ و ۵۰ درجه سلسیوس) بررسی شد. کمپلکس در شرایط قلیایی طبق بخش ۲-۳-۲ تهیه شد.

۲-۴- تعیین خصوصیات کمپلکس

۲-۴-۱- طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز

طیف مادون قرمز با دستگاه طیف سنجی FT-IR (بروکر^۱، مدل TENSOR27، آلمان) در محدوده ی عدد موجی ۴۰۰ تا ۴۰۰۰ بر سانتی متر و توسط قرص‌های پتاسیم بروماید در دمای اتاق با قدرت تفکیک ۴ بر سانتی متر بدست آمد. کمپلکس ژلاتین- موسیلاژ بزرگ به عنوان نمونه شاهد استفاده شد.

۲-۴-۲- اسپکتروفوتومتری فرابنفش- مرئی سطح

جامد

طیف انعکاسی جامد با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر فرابنفش- مرئی (جاسکو^۲، مدل V-670، ژاپن) تهیه شد. کمپلکس ژلاتین- موسیلاژ بزرگ به عنوان نمونه شاهد استفاده شد.

۲-۴-۳- میکروسکوپ الکترونی روبشی

(SEM)

خصوصیات مورفولوژیکی کمپلکس‌ها با استفاده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی (فیلیپس^۳، مدل X 130، هلند) با ولتاژ ۲۰ کیلوولت بررسی شد. همه نمونه‌ها با لایه نازک طلا تحت اتمسفر آرگون پوشش داده شدند. کمپلکس ژلاتین- موسیلاژ بزرگ به عنوان نمونه شاهد استفاده شد.

۲-۴-۴- راندمان کمپلکس

کمپلکس به یک پتری دیش انتقال داده شد و در خشک کن انجمادی خشک شد. وزن کمپلکس خشک از طریق

و همکاران (۲۰۱۶) و با اندکی تغییرات تهیه شد [۸]. محلول موسیلاژ قطره قطره به محلول ژلاتین در دمای ۵۰ درجه سلسیوس اضافه شد (غلظت کل زیست پلیمرها ۲ درصد وزنی/حجمی بود) و pH با استیک اسید ۵۰ درصد (حجمی/حجمی) بر روی ۳/۵ تنظیم شد. محلول به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکردار با ۲۰۰ دور در دقیقه و دمای ۵۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس pH محلول تانیک اسید را نیز با استیک اسید ۵۰ درصد (حجمی/حجمی) بر روی ۳/۵ تنظیم نموده و مقدار مشخصی از محلول تانیک اسید اکسید به محلول ژلاتین- موسیلاژ اضافه شد به گونه‌ای که غلظت نهایی تانیک اسید اکسید ۵ درصد غلظت کل زیست پلیمرها باشد. سپس، کمپلکس به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکردار با ۲۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴۰ درجه سلسیوس قرار گرفت. پس از آن به مدت یک شب در یخچال ۴ درجه سلسیوس به منظور تکمیل اتصالات قرار داده شد. سپس در دمای محیط با ۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (سیگما^۱ مدل 6K15، آلمان) شده و برای حذف تانیک اسید اکسید آزاد دو مرتبه هم با آب مقطر شست و شو شده و مجدداً سانتریفیوژ شد. کمپلکس حاصل پس از خشک شدن در خشک کن انجمادی، آسیاب شده و در یخچال نگهداری شد.

کمپلکس سه گانه در pH قلیایی طبق روش اوسیری و همکاران و با اندکی تغییرات تهیه شد [۱۰]. pH محلول ژلاتین با سود ۱ نرمال بر روی ۹ تنظیم شده و سپس مقدار مشخصی از محلول تانیک اسید اکسید به ژلاتین اضافه شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکردار با ۲۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴۰ درجه سلسیوس قرار گرفت. پس از آن محلول موسیلاژ به صورت قطره قطره به محلول ژلاتین- تانیک اسید اکسید اضافه شده و pH نهایی بوسیله ی استیک اسید ۵۰ درصد (حجمی/حجمی) بر روی ۳/۵ تنظیم شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با ۲۰۰ دور در دقیقه و دمای ۵۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. محلول نهایی طبق روش اسیدی سانتریفیوژ، شست و شو، خشک و

2. Bruker
3. JASCO
4. Scanning electron microscopy5- Philips

1. Sigma

تائیک اسید در محدوده ۱۰ تا ۱۰۰ پی پی ام تهیه شده و معادله استاندارد با ضریب $R^2=0/98$ بدست آمد:

$$\text{رابطه (۲-۴)} \quad -0/1074$$

۰/۱۳۶ (میلی گرم تائیک اسید) = میزان جذب (۷۶۰ نانومتر)

۲-۴-۸- رنگ سنجی

رنگ کمپلکس با دستگاه رنگ سنج (نیپون مدل ZE6000، ژاپن) اندازه گیری شد. ارزیابی رنگ نمونه‌ها در رنگ سنج بر پایه سیستم رنگ L^* ، a^* و b^* انجام گرفت. در این سیستم شاخص L^* درجه روشنایی (سفیدی یا سیاهی)، شاخص a^* تمایل به قرمز یا سبز بودن و شاخص b^* درجه زرد یا آبی بودن را نشان می‌دهد. شاخص‌های a^* و b^* اگر منفی بود نشان دهنده غالب بودن رنگ سبز و آبی است. نکته قابل توجه این است که باید فاکتورهای L^* ، a^* و b^* بر اساس متوسط نور روز که با D_{65} نشان داده شده و استاندارد می‌باشد، تعیین شود.

۲-۵- تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

آزمایشات به صورت طرح کاملاً تصادفی و فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS انجام گرفت. آزمون مقایسه میانگین نیز به روش حداقل تفاوت معنی دار (LSD) در سطح اطمینان ۹۵ درصد انجام شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- کمپلکس سه گانه در شرایط اسیدی

و قلیایی

۳-۱-۱- طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز

طیف‌های FT-IR نمونه‌های شاهد، اسیدی و قلیایی در شکل ۱- الف نشان داده شده است. تغییرات در ساختار ثانویه پروتئین و همچنین تشکیل کمپلکس در بین اجزاء با بررسی چهار منطقه از طیف FT-IR قابل ارزیابی است. ناحیه ۲۹۰۰-۳۴۰۰ بر سانتی متر OH و NH کششی را نشان می‌دهد. ناحیه ۲۹۰۰-۳۰۰۰ بر سانتی متر، $C-H=$ آلیفاتیک و NH_3^+ کششی، ناحیه ۱۷۰۰-

اختلاف وزن پتری دیش قبل و بعد از خشک کردن بدست آمده و راندمان کمپلکس از طریق رابطه ۲-۱ بدست می‌آید:

$$\text{رابطه (۲-۱)} \quad 100 \times [\text{وزن زیست پلیمرهای}]$$

اولیه /وزن کمپلکس خشک شده] = راندمان کمپلکس (%)

۲-۴-۵- حجم کمپلکس

حجم کمپلکس از طریق رابطه ۲-۲ محاسبه می‌شود:

$$\text{رابطه (۲-۲)} \quad 100 \times [\text{حجم کل محلول زیست پلیمرها}]$$

/حجم بخش نامحلول کمپلکس] = حجم کمپلکس (%)

۲-۴-۶- حلالیت

حلالیت کمپلکس طبق روش گلاسیا و همکاران (۲۰۱۳) تعیین شد [۲۴]. ۰/۵ گرم نمونه توزین شده و ۵۰ میلی لیتر آب مقطر به آن اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سلسیوس بر روی همزن مغناطیسی (آیکا مدل 2 RH Basic آلمان) ۱۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت. سپس به مدت ۵ دقیقه در ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. فاز رویی خارج شد و باقی مانده در پتری دیش قرار گرفته و در آن خلاء با دمای ۷۰ درجه سلسیوس خشک شده تا به وزن ثابت رسید. حلالیت نمونه‌ها از طریق اندازه گیری اختلاف وزن پتری دیش بدست آمد (رابطه ۲-۳).

$$\text{رابطه (۲-۳)} \quad 100 \times$$

(وزن اولیه نمونه /اختلاف وزن پتریدیش] = حلالیت (%)

۲-۴-۷- محتوای فنولیک کل (TPC)^۱

محتوای فنولیک کل طبق روش وو و همکاران با اندکی تغییرات اندازه گیری شد [۲۵]. همانند اندازه گیری حلالیت و طبق مرحله قبل، پس از سانتریفیوژ کردن نمونه مقدار نیم میلی لیتر از فاز رویی برداشته و با یک دهم از محلول فولین-سیوکالتیو^۲ (دو برابر رقیق شده با آب دیونیزه) مخلوط شد. بعد از سه دقیقه ۱/۵ میلی لیتر محلول ۲ درصد کربنات سدیم اضافه شد. مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط قرار داده شد. جذب نمونه در طول موج ۷۶۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفوتومتر (پی جی اینسترومنت^۳ مدل T60، انگلستان) قرائت شد. منحنی استاندارد با استفاده از

1. Total phenolic content
2. Folin - Ciocalteu reagent
3. PG INSTRUMENT

4. NIPPON

قوی تری نسبت به کمپلکس اسیدی می باشد. در مطالعه ای بر روی تاثیر pH بر برهمکنش پروتئین های سرم آلبومین گاوی، لیزوزیم و آلفا-لاکتالبومین- پلی فنول کلروژنیک اسید، بیان شد که در pH پایین برهمکنش های غیر کووالانسی بین کلروژنیک اسید و سرم آلبومین گاوی، لیزوزیم و آلفا-لاکتالبومین ایجاد شده در حالی که با افزایش pH به بیشتر از ۷، پیوند کووالانسی بین پروتئین لیزوزیم و کلروژنیک اسید تشکیل می شود و آن را با تشکیل رادیکال ها یا کینون های بیشتر ناشی از اکسیداسیون خود به خودی کلروژنیک اسید در pH بالاتر مرتبط دانستند که متعاقبا با پروتئین ها به صورت کووالانسی واکنش می دهد [۲]. وجود نوار جذبی مربوط به گروه های C-N و N-H در نمونه شاهد به این دلیل است که در ساختار ژلاتین هم اسیدهای آمینه ای وجود دارد که می تواند پیوند C-N و N-H تشکیل دهد.

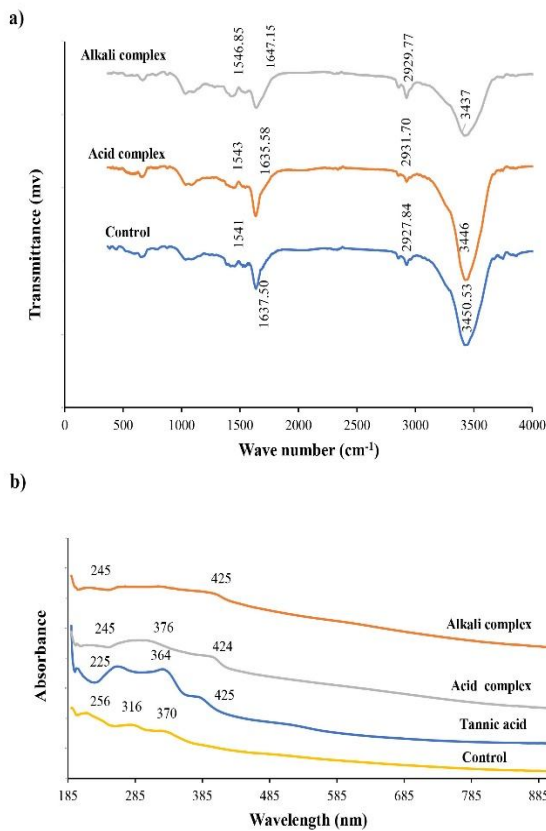


Fig 1 Fourier infrared spectroscopy of control, acid and alkali complex powders (a), solid state uv-visible spectrophotometry of tannic acid, control, acid and alkali complex powders (b).

۱۵۰۰ بر سانتی متر $C=O$ کششی و NH خمشی و ناحیه ۱۳۳۵-۱۵۶۰ بر سانتی متر $N-H$ خمشی و $C-N$ کششی را نشان می دهند [۸]. نمونه شاهد فاقد تانیک اسید اکسید رطوبت بیشتری را در ساختار ژل خود حفظ کرده است و عدد موجی مربوط به گروه OH (۳۴۵۰ بر سانتی متر) در آن بیشتر از سایر نمونه ها دیده می شود. اما در کمپلکس قلیایی میزان این عدد موجی کمتر از نمونه اسیدی است که این می تواند بدلیل قوی تر بودن اتصالات و به دنبال آن خروج بیشتر رطوبت از کمپلکس قلیایی باشد و یا اینکه می تواند بدلیل درگیر بودن بیشتر گروه های هیدروکسیل در پیوندها باشد. به طور مشابه، انوری و همکاران (۲۰۱۶) با افزودن تانیک اسید غیر اکسید و تانیک اسید به کمپلکس صمغ عربی و صمغ موسیلاژ کاهش شدیدی در نوار جذبی گروه هیدروکسیل مشاهده کرده و آن را به تشکیل پیوند هیدروژنی بیشتر در ساختار سه گانه مرتبط دانستند [۸].

همچنین، در مطالعه ای دیگر، اضافه کردن تانیک اسید به کمپلکس ژلاتین-پکتین با درجه متوکسیل بالا سبب جابجایی نوار جذبی مربوط به گروه هیدروکسیل شد [۹]. اعداد موجی مربوط به گروه های آمین و کربوکسیل که به ترتیب مربوط به ژلاتین و موسیلاژ بزرگ می باشند (عدد موجی ۲۹۲۷ بر سانتی متر مربوط به گروه NH_3^+ ژلاتین و عدد موجی ۱۶۳۷ بر سانتی متر نیز مربوط به COO^- موسیلاژ می باشد). جابجایی این اعداد موجی در دو کمپلکس اسیدی و قلیایی نسبت به نمونه شاهد نشان دهنده برهمکنش بین این دو ماده با تانیک اسید و تشکیل پیوند می باشد. نوار جذبی مربوط به گروه های $C-N$ و $N-H$ که نشان دهنده اتصال کووالانسی بین تانیک اسید-موسیلاژ-ژلاتین می باشد نیز در محدوده ۱۳۰۰ تا ۱۵۰۰ بر سانتی متر ظاهر می شود. از جابه جایی بیشتر این نوار جذبی در کمپلکس قلیایی نسبت به کمپلکس اسیدی می توان اینگونه برداشت کرد که احتمالاً کمپلکس قلیایی دارای پیوندهای

قوی بوده و باعث حذف نوار جذب عدد موجی ۳۷۶ نانومتر در نمونه قلیایی می‌شود.

۳-۱-۳- تعیین خصوصیات کمپلکس‌های اسیدی و قلیایی

حجم کمپلکس نمونه‌های شاهد، اسیدی و قلیایی در جدول ۱ نشان داده شد. نتایج نشان می‌دهد که نمونه شاهد به طور معناداری بیشترین میزان حجم کمپلکس (%/ را نسبت به نمونه‌های اسیدی و قلیایی داشته است ($p < 0.05$). شاید به دلیل عدم وجود ماده اتصال دهنده عرضی در نمونه شاهد و تنها حضور برهمکنش الکترواستاتیک، استحکام پیوند ضعیف بوده و رطوبت بیشتری را نگه داشته است که منجر به حجم کمپلکس بالاتر می‌شود. در مورد نمونه‌های اسیدی و قلیایی، تشکیل پیوندهای هیدروژنی، آگریز و کووالانسی باعث کاهش چشمگیر حجم در مقایسه با شاهد شد. این نتایج مطابق با گزارش‌های انوری و همکاران (۲۰۱۶) بود، که از تانیک اسید اکسید و غیر اکسید برای ایجاد اتصال عرضی با ژلاتین در ژل توده‌ی مرکب ژلاتین- صمغ عربی استفاده کرد. آن‌ها نتیجه گرفتند که تانیک اسید غیر اکسید به دلیل اتصالات محکم‌تر باعث می‌شود آب را از ساختار خود خارج ساخته و حجم توده‌ی مرکب را بیشتر کاهش دهد و نهایتاً رطوبت کمتری در ژل باقی بماند [۸].

۳-۱-۲- اسپکتروفتومتری فرابنفش - مرئی حالت جامد

اسپکتروفتومتری فرابنفش - مرئی حالت جامد نیز برای تأیید تشکیل کمپلکس‌ها و شناسایی واکنش‌های انتقال بار که ممکن است اتفاق بیفتد استفاده شد (شکل ۱-ب). هنگامی که یک مولکول نور (انرژی) فرابنفش را جذب می‌کند، در زمان استراحت به حالت انرژی بالاتری ارتقا می‌یابد. انرژی به شکل پرتویی منتشر می‌شود که در طول موج‌های مختلف به شکل قله ظاهر می‌شود [۲۶]. در نمونه تانیک اسید، سه نوار جاذب وجود دارد که در ۲۲۵ نانومتر، مربوط به حضور NH، OH، CO و SH هستند. همچنین، نوار در ۳۶۴ نانومتر حضور COOH، NO₂، N=N، C=N، C=O، CONH₂ و COOR را نشان داد. علاوه بر این، نوار جذب در ۴۲۵ از سیستم آروماتیک تشکیل شده است. به طور مشابه، سه نوار جذب کمتر از ۴۰۰ نانومتر، پیوندانگر NH، OH، CO، SH، C=O، C=N، N=N، COOH، NO₂ و COOR - مربوط به ساختار موسیلاژ بزرگ و ژلاتین در نمونه شاهد مشاهده شد. در کمپلکس‌های اسیدی و قلیایی، ظاهر شدن موج ۴۲۵ نانومتر حضور تانیک اسید اکسید در کمپلکس‌ها را تأیید می‌کند. علاوه بر این، دو و سه باند جذب به ترتیب در مجموعه قلیایی و اسیدی مشاهده شد. می‌توان استدلال کرد که برهمکنش بین جفت‌های الکترونی بیش از حد

Table 1 Volume, water solubility and total phenolic content of control, alkali and acid complexes

Sample	Total phenolic content (mg/g DM)	Complex volume (%)	Water Solubility (%)
Control	15.22 ± 1.19 ^c	63.50 ± 2.12 ^a	11.90 ± 0.70 ^a
Alkali complex	129.53 ± 3.32 ^a	31.73 ± 4.07 ^b	3.65 ± 0.63 ^c
Acid complex	60.53 ± 4.98 ^b	37.98 ± 0.67 ^b	6.18 ± 0.42 ^b

The different letters in each column represent significant difference at $p < 0.05$.

قوی‌تر موجود در کمپلکس قلیایی است که توسط FT-IR تأیید شده است.

کمپلکس‌های سه گانه نسبت به ترکیب شاهد مزدوج بیشترین محتوای فنولیک را نشان دادند ($p < 0.05$). این

حلالیت آبی پودرها نیز تعیین شد و بیشترین مقدار مربوط به نمونه شاهد بود که در آن پیوندهای اصلی الکترواستاتیک و نوع کووالانسی کمتر از کمپلکس‌های اسیدی و قلیایی بود (جدول ۱). حلالیت نمونه اسیدی بیشتر از نمونه قلیایی بود که احتمالاً به دلیل اتصالات

نتیجه نشان داد که تانیک اسید اکسید می‌تواند تا حدودی در ژلاتین- موسیلاژ نفوذ کند. اگرچه محتوای اصلی تانیک اسید اکسید برای همه نمونه‌ها ثابت بود، اما بین محتوای فنولیک کمپلکس‌های اسیدی و قلیایی تفاوت معناداری وجود داشت و بالاترین مقدار برای تیمار قلیایی گزارش شد. این نشان می‌دهد که گروه هیدروکسیل یا حلقه آروماتیک تانیک اسید اکسید در pH اسیدی ممکن است واکنش بیشتری نسبت به کینون الکتروفیل تانیک اسید اکسید موجود در pH قلیایی با مزدوج ژلاتین- صمغ بدهند. همچنین، اووسیری و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که که میزان فنولیک کمپلکس ژلاتین- تانیک اسید تهیه شده در pH برابر ۷ بیش از pH برابر ۹ است [۱۰].

با توجه به یافته‌های بدست آمده و با توجه به این که تغییرات طیف FT-IR کمپلکس قلیایی نسبت به کمپلکس اسیدی بیشتر است و کمپلکس قلیایی دارای محتوای فنولیک بیشتر و حلالیت در آب کمتری نسبت به نمونه اسیدی است، کمپلکس قلیایی به عنوان بهترین کمپلکس انتخاب شد و و بنابراین اثر غلظت‌های مختلف تانیک اسید اکسید و همچنین دمای واکنش ژلاتین و تانیک اسید اکسید بر روی خصوصیات کمپلکس مورد بررسی قرار گرفت.

۲-۳- تاثیر شرایط واکنش بر خصوصیات کمپلکس

۱-۲-۳- طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز

طیف سنجی FT-IR کمپلکس‌های حاوی ۱۰، ۵، ۲/۵ و ۰/۵ درصد تانیک اسید اکسید در سه دمای ۳۰، ۴۰ و ۵۰ درجه‌ی سلسیوس در شکل ۲ نشان داده شده است. نوار جذبی مربوط به گروه هیدروکسیل در محدوده‌ی ۳۴۰۰-۲۹۰۰ بر سانتی متر مشخص شده است. عدد موجی به ترتیب در دماهای ۳۰، ۴۰ و ۵۰ درجه

سلسیوس مربوط به گروه هیدروکسیل برای کمپلکس‌های OTA-10 (۳۴۲۳، ۳۴۲۵، ۳۴۲۱ بر سانتی متر)، OTA-5 (۳۴۳۵، ۳۴۲۹، ۳۴۱۹ بر سانتی متر)، OTA-2.5 (۳۴۳۰، ۳۴۳۲/۲۴، ۳۴۳۱/۰۲ بر سانتی متر) و OTA-0.5 (۳۴۲۷، ۳۴۲۵، ۳۴۲۳ بر سانتی متر) گزارش شد. بررسی طیف FT-IR همه کمپلکس‌ها در دمای ۳۰ درجه‌ی سلسیوس نشان می‌دهد که عدد موجی مربوط به گروه هیدروکسیل در کمپلکس حاوی ۱۰ درصد تانیک اسید اکسید نسبت به ۵، ۲/۵ و ۰/۵ درصد تانیک اسید اکسید کمتر است که احتمالاً مربوط به دیمریزه شدن تانیک اسید اکسید در غلظت بالا و شکسته شدن اتصالات ژلاتین- موسیلاژ و آزاد شدن گروه‌های هیدروکسیل است. بیشترین عدد موجی مربوط به گروه هیدروکسیل در دمای ۳۰ درجه سلسیوس مربوط به غلظت ۵ درصد تانیک اسید اکسید می‌باشد که نشان دهنده اتصالات بیشتر تانیک اسید اکسید با ژلاتین- موسیلاژ و درگیر بودن گروه‌های هیدروکسیل بیوپلیمرهاست. با افزایش دمای واکنش ژلاتین- تانیک اسید اکسید به ۴۰ درجه سلسیوس جابه‌جایی این نوار جذبی در هر غلظتی به اعداد موجی کمتر نشان دهنده شکسته شدن تعدادی از اتصالات و آزاد شدن گروه‌های هیدروکسیل می‌باشد. برهمکنش‌های بین سرم آلبومین گاوی و O-5-کافنولیکینیک در دماهای ۵، ۲۵ و ۶۰ درجه سلسیوس ارزیابی و بیان شد وابستگی اتصال O-5-کافنولیکینیک به سرم آلبومین گاوی با افزایش دما کاهش می‌یابد [۲۷]. به طور مشابه، گزارش شد دما بر پیوند بین ترکیبات فنولی و پروتئین تأثیر داشته به طوری که افزایش دما باعث کاهش پیوند هیدروژنی می‌شود [۲۸ و ۲].

عدد موجی گروه آمین به ترتیب در دماهای ۳۰، ۴۰ و ۵۰ درجه سلسیوس برای کمپلکس OTA-10 (۲۸۴۸، ۲۹۲۹، ۲۹۳۱ بر سانتی متر)، OTA-5 (۲۹۲۷، ۲۹۲۵، ۲۹۳۱ بر سانتی متر)، OTA-2.5 (۲۹۲۷، ۲۹۲۳، ۲۹۲۹ بر سانتی متر)،

بر سانتی متر)، OTA-0.5 (۲۹۲۷، ۲۹۲۵، ۲۹۲۹ بر سانتی متر) ثبت شد. گروه آمین برای نمونه‌های کمپلکس در دمای ۳۰ درجه سلسیوس نشان داد که عدد موجی مربوط به کمپلکس حاوی ۱۰ درصد تانیک اسید اکسید دارای کمترین مقدار نسبت به سایر کمپلکس‌ها است و این نشان دهنده واکنش کمتر گروه آمین با تانیک اسید اکسید و پیوندهای الکترواستاتیک کمتر بین ژلاتین-موسیلاژ است. اگرچه، با افزایش دما به ۴۰ درجه سلسیوس بیشترین تغییرات مربوط به کمپلکس حاوی ۱۰ درصد تانیک اسید اکسید است که احتمالاً به علت تشدید پیوند تانیک اسید اکسید با ژلاتین می‌باشد و عدد موجی افزایش می‌یابد. با این وجود، تفاوت معناداری بین نمونه‌های ۴۰ و ۵۰ درجه مشاهده نشد.

علاوه بر این، نوار جذبی مربوط به OTA-10 (۱۵۸۳، ۱۶۵۲، ۱۶۵۶ بر سانتی متر)، OTA-5 (۱۶۳۹، ۱۶۴۱، ۱۶۳۹ بر سانتی متر)، OTA-2.5 (۱۶۳۷، ۱۶۳۹، ۱۶۴۱ بر سانتی متر)، OTA-0.5 (۱۶۳۳، ۱۶۳۵، ۱۶۳۵ بر سانتی متر) به ترتیب در دماهای ۳۰، ۴۰ و ۵۰ درجه سلسیوس مشاهده شد. عدد موجی گروه کربوکسیل برای همه‌ی کمپلکس‌ها در دمای ۳۰ درجه سلسیوس نشان می‌دهد که کمپلکس حاوی ۱۰ درصد تانیک اسید اکسید دارای کمترین مقدار است که بیانگر اتصالات الکترواستاتیک ضعیف بین موسیلاژ و ژلاتین است و ژلاتین تمایل بیشتری برای اتصال با تانیک اسید اکسید دارد و بیشترین عدد موجی مربوط به کمپلکس حاوی ۵ درصد تانیک اسید اکسید می‌باشد که نشان دهنده قوی‌تر بودن کمپلکس است. با افزایش دما به ۴۰ درجه سلسیوس بیشترین تغییرات مربوط به کمپلکس حاوی ۱۰ درصد تانیک اسید اکسید است. با افزایش دما به ۴۰ درجه سلسیوس به علت این که در کمپلکس حاوی ۱۰ درصد تانیک اسید اکسید، تمایل به اتصال تانیک اسید اکسید با ژلاتین افزایش می‌یابد، بنابراین عدد موجی مربوط به گروه C-N افزایش می‌یابد. در دمای ۵۰ درجه تغییرات معناداری بین اعداد موجی پیوند C-N کمپلکس‌ها با دمای ۴۰ درجه سلسیوس وجود ندارد. با توجه به این نتایج کمپلکس حاوی ۵ درصد تانیک اسید اکسید در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد بدلیل بیشترین تغییرات مربوط به گروه‌های هیدروکسیل، آمین، کربوکسیل و پیوند C-N که احتمالاً نشان دهنده پیوندهای کووالانسی بیشتر در کمپلکس می‌باشد از سایر کمپلکس‌ها قوی‌تر است. در مطالعه‌ای که توسط انواری و همکاران (۲۰۱۶) انجام شده است، گزارش شد که توانایی گروه‌های هیدروکسیل تانیک اسید بیشتر از گروه‌های کینون تانیک اسید برای اتصال به ژلاتین و صمغ عربی است. همچنین، مشاهده شد که در غلظت‌های بالاتر ۰/۲ و ۰/۳ تانیک اسید اکسید، اتصالات الکترواستاتیک بین ژلاتین و صمغ عربی شکسته شده و در نهایت پیوندهای محکم بین ژلاتین و

بر سانتی متر)، OTA-0.5 (۲۹۲۷، ۲۹۲۵، ۲۹۲۹ بر سانتی متر) ثبت شد. گروه آمین برای نمونه‌های کمپلکس در دمای ۳۰ درجه سلسیوس نشان داد که عدد موجی مربوط به کمپلکس حاوی ۱۰ درصد تانیک اسید اکسید دارای کمترین مقدار نسبت به سایر کمپلکس‌ها است و این نشان دهنده واکنش کمتر گروه آمین با تانیک اسید اکسید و پیوندهای الکترواستاتیک کمتر بین ژلاتین-موسیلاژ است. اگرچه، با افزایش دما به ۴۰ درجه سلسیوس بیشترین تغییرات مربوط به کمپلکس حاوی ۱۰ درصد تانیک اسید اکسید است که احتمالاً به علت تشدید پیوند تانیک اسید اکسید با ژلاتین می‌باشد و عدد موجی افزایش می‌یابد. با این وجود، تفاوت معناداری بین نمونه‌های ۴۰ و ۵۰ درجه مشاهده نشد.

علاوه بر این، نوار جذبی مربوط به OTA-10 (۱۵۸۳، ۱۶۵۲، ۱۶۵۶ بر سانتی متر)، OTA-5 (۱۶۳۹، ۱۶۴۱، ۱۶۳۹ بر سانتی متر)، OTA-2.5 (۱۶۳۷، ۱۶۳۹، ۱۶۴۱ بر سانتی متر)، OTA-0.5 (۱۶۳۳، ۱۶۳۵، ۱۶۳۵ بر سانتی متر) به ترتیب در دماهای ۳۰، ۴۰ و ۵۰ درجه سلسیوس مشاهده شد. عدد موجی گروه کربوکسیل برای همه‌ی کمپلکس‌ها در دمای ۳۰ درجه سلسیوس نشان می‌دهد که کمپلکس حاوی ۱۰ درصد تانیک اسید اکسید دارای کمترین مقدار است که بیانگر اتصالات الکترواستاتیک ضعیف بین موسیلاژ و ژلاتین است و ژلاتین تمایل بیشتری برای اتصال با تانیک اسید اکسید دارد و بیشترین عدد موجی مربوط به کمپلکس حاوی ۵ درصد تانیک اسید اکسید می‌باشد که نشان دهنده قوی‌تر بودن کمپلکس است. با افزایش دما به ۴۰ درجه سلسیوس بیشترین تغییرات مربوط به کمپلکس حاوی ۱۰ درصد تانیک اسید اکسید است که نشان دهنده قوی‌تر بودن کمپلکس است. با افزایش دما به ۴۰ درجه سلسیوس بیشترین تغییرات مربوط به کمپلکس حاوی ۱۰ درصد تانیک اسید اکسید است. با افزایش دما به ۴۰ درجه سلسیوس به علت این که در کمپلکس حاوی ۱۰ درصد تانیک اسید اکسید، تمایل به اتصال تانیک اسید اکسید با ژلاتین افزایش می‌یابد، بنابراین عدد موجی مربوط به گروه C-N افزایش می‌یابد. در دمای ۵۰ درجه تغییرات معناداری بین اعداد موجی گروه کربوکسیل کمپلکس با دمای ۴۰ درجه وجود نداشت.

عدد موجی پیوند C-N به ترتیب در سه دمای ۳۰، ۴۰ و ۵۰ درجه سلسیوس در OTA-10

تانیک اسید ایجاد شده است [۸].

اسید اکسید در دمای ۵۰ درجه ی سانتیگراد داراست که بدلیل کمتر بودن ماده ی خشک و همچنین کاهش اتصالات با افزایش دما می باشد.

در دمای ۳۰ درجه سلسیوس غلظت بالای تانیک اسید اکسید بر روی راندمان موثر است به طوری که بیشترین راندمان متعلق به OTA-10 بود. این مسئله می تواند ناشی از بیشتر بودن ماده خشک کمپلکس حاوی ۱۰ درصد تانیک اسید اکسید و به دنبال آن افزایش تعداد اتصالات هیدروژنی، هیدروفوبی، کووالانسی و یونی در نمونه باشد (جدول ۲). با افزایش دما راندمان کمپلکس بدلیل ضعیف شدن پیوندهای هیدروژنی کاهش می یابد. نمونه حاوی ۰/۵ درصد تانیک اسید اکسید در دمای ۵۰ درجه سلسیوس کمترین میزان راندمان کمپلکس را نشان داد که می تواند با کمتر بودن ماده خشک و همچنین کاهش اتصالات با افزایش دما مرتبط باشد.

حجم کمپلکس با قدرت و تعداد پیوندهای بین زیست پلیمرها ارتباط دارد، به گونه ای که هر چه تعداد اتصالات بیشتر و ضعیف تر باشد می تواند حجم آب بیشتری را در خود حفظ نماید. مشاهده می شود که در دمای پایین غلظت تانیک اسید اکسید در حجم کمپلکس موثر است به تحوی که کمپلکس حاوی ۱۰ درصد

تانیک اسید اکسید در دمای ۳۰ درجه سلسیوس بیشترین حجم کمپلکس را داراست و این واقعیت نشان می دهد که اتصالات هیدروژنی، هیدروفوبی، کووالانسی و یونی در کمپلکس بیشتر بوده و درگیری آب در کمپلکس افزایش یافته و نهایتا موجب شده است که حجم آب بیشتری را در خود نگه دارد. در حالی که با افزایش دما غلظت تانیک اسید اکسید حتی در مقدار ۵ درصد هم تاثیر گذار می شود و حجم کمپلکس آن افزایش می یابد. در دمای ۵۰ درجه سلسیوس، با کاهش درگیری آب در کمپلکس و کاهش حجم، کمترین میزان حجم کمپلکس متعلق به نمونه حاوی ۱۰ درصد تانیک اسید اکسید است که این نشان دهنده ضعیف شدن پیوندهای هیدروژنی و هیدروفوبی و قوی تر شدن اتصالات کووالانسی در طی افزایش دما است. رطوبت نمونه ۵ درصد تانیک اسید اکسید در دمای ۳۰ درجه سلسیوس از سایر نمونه ها کمتر است که می تواند ناشی از تعداد پیوندهای زیاد بین زیست پلیمرها و قوی تر بودن پیوندها و در نهایت کم بودن رطوبت در نمونه باشد.

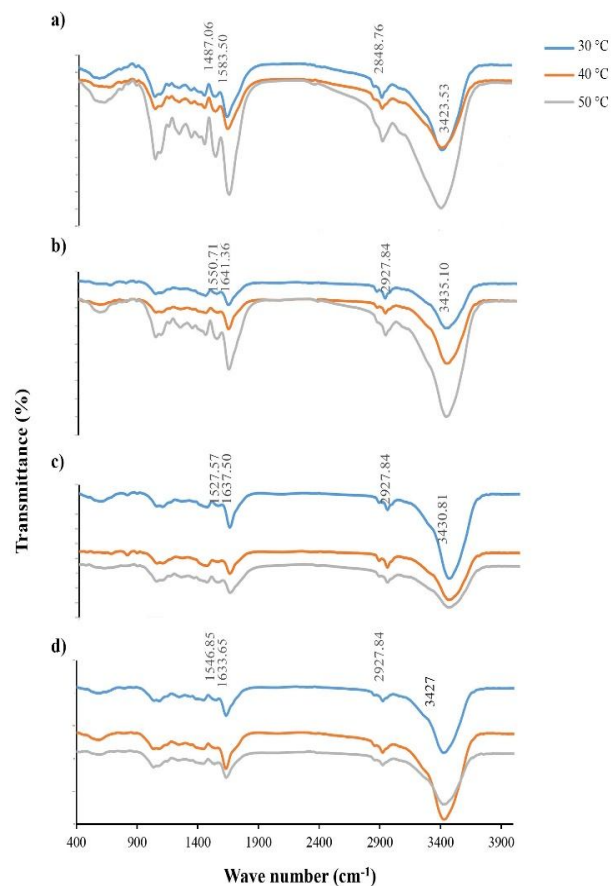


Fig 2 Fourier infrared spectroscopy of complexes of OTA-10 (a), OTA-5 (b), OTA-2.5 (c) and OTA-0.5 (d) at 30, 40 and 50 °C. OTA-10, OTA-5, OTA-2.5 and OTA-0.5 indicated 10, 5, 2.5 and 0.5 % tannic acid oxid in tertiary complex, respectively.

۳-۲-۲- خواص فیزیکی

راندمان کمپلکس ها در شکل ۳-۱۰ نشان داده شده است. در دمای ۳۰ درجه ی سانتیگراد غلظت بالای تانیک اسید اکسید بر روی راندمان موثر است. راندمان کمپلکس ۱۰ درصد تانیک اسید اکسید در دمای ۳۰ درجه ی سانتیگراد (دمای واکنش ژلاتین - تانیک اسید اکسید) بیشترین مقدار را داراست که این بدلیل بیشتر بودن ماده ی خشک کمپلکس حاوی ۱۰ درصد تانیک اسید اکسید و به دنبال آن افزایش تعداد اتصالات هیدروژنی - هیدروفوبی - کووالانسی و یونی در نمونه است. با افزایش دما راندمان کمپلکس کاهش می یابد که احتمالاً بدلیل ضعیف شدن پیوند های هیدروژنی و هیدروفوبی است. غلظت تانیک اسید اکسید هم در راندمان موثر نیست. کمترین میزان راندمان کمپلکس را نمونه ی حاوی ۰/۵ درصد تانیک

Table 2 The complex yield and the complex volume of OTA-10, OTA-5, OTA-2.5 and OTA-0.5 complexes at reaction temperatures 30, 40 and 50 °C

OTA concentration (%)	Temperature (°C)	Complex Yield (%)	Complex Volume (%)
0.5	30	44.26±.59 ^{bc}	50.00±0.84 ^b
	40	44.61±1.48 ^{bc}	49.06±.19 ^b
	50	36.65±4.05 ^d	32.76±.70 ^{de}
2.5	30	44.30±2.00 ^{bc}	48.52±3.46 ^b
	40	43.86±.24 ^{bc}	50.84±0.19 ^b
	50	41.46±.33 ^c	34.80±2.07 ^d
5	30	43.82±1.64 ^{bc}	44.71±2.03 ^c
	40	44.52±1.66 ^{bc}	24.51±0.68 ^f
	50	43.43±2.97 ^{bc}	30.47±0.00 ^c
10	30	52.93±2.87 ^a	56.86±0.53 ^a
	40	46.65±.79 ^b	30.08±0.65 ^c
	50	44.51±.05 ^{bc}	14.81±1.31 ^g

The different letters in each column represent significant difference at $p < 0.05$.

اکسید و به دنبال آن تمایل کمتر به برقراری پیوند کووالانسی با ژلاتین است. با افزایش دما، حلالیت آبی نیز افزایش یافته است که ممکن است به دلیل تضعیف پیوندهای هیدروژنی و آزاد سازی گروه‌های هیدروکسیل بیشتر در کمپلکس باشد. بیشترین حلالیت مربوط به نمونه ۱۰ درصد تانیک اسید اکسید در دمای ۴۰ و ۵۰ درجه سلسیوس گزارش شد در حالی که کمترین مقدار حلالیت مربوط به نمونه OTA-5 در دمای ۳۰ درجه سلسیوس بود.

حلالیت در آب نمونه‌ها در جدول ۳ نشان داده شده است. کمپلکس حاوی ۵ درصد تانیک اسید اکسید در دو دمای ۳۰ و ۴۰ درجه سلسیوس کمترین حلالیت را نشان داد که بدلیل تعداد زیاد پیوندهای هیدروژنی، هیدروفوبی و همچنین کووالانسی (C-S و C-N) بین تانیک اسید اکسید و کمپلکس ژلاتین-موسیلاژ است. اگرچه، در نمونه حاوی ۱۰ درصد تانیک اسید اکسید حلالیت افزایش یافت که احتمالاً ناشی از افزایش میزان تانیک اسید اکسید و تمایل به دیمریزه شدن تانیک اسید

Table 3 The properties of OTA-10, OTA-5, OTA-2.5 and OTA-0.5 complexes at reaction

OTA concentration (%)	Temperature (°C)	Total phenolic content (mg/g DM)	Color			Water Solubility (%)
			a*	b*	L*	
0.5	30	24.49±2.77 ^c	8.16 ±1.68 ^{ab}	17.71±0.74 ^{bcd}	59.41±4.92 ^a	8.03±0.52 ^b
	40	20.09±2.26 ^c	7.71±0.66 ^{ab}	17.56±0.76 ^{cd}	58.23±3.52 ^{ab}	8.53±1.46 ^b
	50	14.52±0.56 ^c	8.64±0.00 ^{ab}	17.24± 0.02 ^d	53.37±0.00 ^c	10.85±1.01 ^a
2.5	30	40.72±2.17 ^d	7.52±2.12 ^{ab}	18.93±0.51 ^{ab}	58.19±0.25 ^{ab}	7.07±0.76 ^b
	40	38.32±6.84 ^d	8.13±0.43 ^{ab}	18.17±0.37 ^{bcd}	55.52±0.33 ^{abc}	10.77±0.52 ^a
	50	21.72±1.91 ^c	8.08±0.53 ^{ab}	18.31± 0.41 ^{bcd}	50.88±0.79 ^{de}	11.17±0.90 ^a
5	30	85.83±9.065 ^a	6.45±0.77 ^b	20.08±0.98 ^a	54.51±2.68 ^{bcd}	4.75±0.49 ^d
	40	92.80±0.01 ^a	8.16±1.68 ^{ab}	19.09±1.16 ^{ab}	52.91±1/96 ^{ode}	5.38±0.02 ^{cd}
	50	56.99±2.77 ^c	8.02±0.38 ^{ab}	17.72±1.43 ^{bcd}	48.61±0.08 ^{ef}	7.71±0.50 ^b
10	30	70.01±8.45 ^b	7.69±0.14 ^{ab}	18.09±0.33 ^{bcd}	44.69±2.00 ^f	7.05±0.78 ^{bc}
	40	64.41±5.25 ^{bc}	9.4±0.72 ^a	18.23±0.77 ^{bc}	44.41±0.54 ^f	10.90±0.47 ^a
	50	57.97±8.13 ^c	8.6±0.09 ^a	17.95±1.06 ^{bcd}	44.82±0.61 ^f	11.70±0.89 ^a

temperatures 30, 40 and 50 °C

The different letters in each column represent significant difference at $p < 0.05$.

از آن جا که رنگ محلول تانیک اسید اکسید به pH (شکل ۳-ب) و غلظت محتوای فنولی بستگی دارد، رنگ کمپلکس سه گانه مشخص شد (جدول ۳). از نظر شاخص روشنایی (L^*)، کمپلکس های OTA-0.5 و OTA-2.5 به دلیل کاهش محتوای تانیک اسید اکسید، از رنگ روشن تری برخوردار بودند و در بین کمپلکس حاوی ۵ و ۱۰ درصد تانیک اسید اکسید کمپلکس حاوی ۵ درصد تانیک اسید روشن تر بود. با افزایش دما از ۳۰ به ۵۰ درجه سلسیوس، شاخص روشنایی در همه غلظت ها کاهش می یابد. اختلاف معنی داری بین شاخص قرمزی در بین نمونه های حاوی ۰/۵ و ۲/۵ درصد تانیک اسید وجود ندارد. بین نمونه ی حاوی ۵ و ۱۰ درصد تانیک اسید اکسید، نمونه ی حاوی ۵ درصد تانیک اسید اکسید در دمای ۳۰ درجه ی سانتیگراد کمترین مقدار قرمزی را نشان می دهد. همچنین بیشترین شاخص زردی (b^*) مربوط به نمونه ی حاوی ۵ درصد تانیک اسید اکسید است و این کمپلکس می تواند در محصولات غذایی کاربرد بهتری داشته و مانع از تغییر رنگ محصول شود.

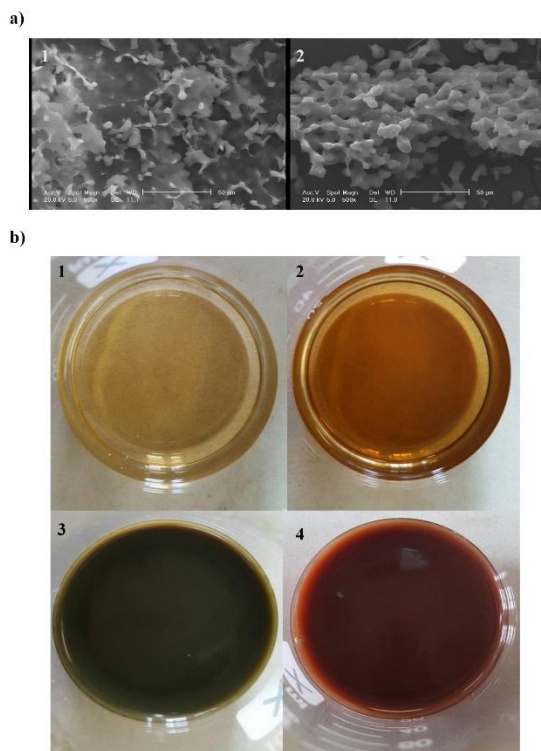


Fig 3 SEM images of complexes before (1) and after (2) adding of OTA-5 (a), the color of tannic acid solution at different pH, non-OTA at pH=3.25 (1), non-OTA at pH=9 (2), OTA at pH=9 (3), OTA at pH=3.5 (4) (b).

محتوای فنولیک نمونه ها در جدول ۳-۲ نشان داده شده است. در بین کمپلکس های با غلظت های مختلف تانیک اسید اکسید، کمپلکس حاوی ۵ درصد در دمای ۳۰ و ۴۰ درجه ی سانتیگراد بیشترین مقدار را دارد که نشان دهنده ی بیشتر بودن تعداد اتصالات هیدروفوبی و کووالانسی بین تانیک اسید اکسید و ژلاتین - موسیلاژ است. کمترین میزان فنولیک هم مربوط به نمونه ی حاوی ۰/۵ درصد (دمای ۳۰، ۴۰ و ۵۰ درجه ی سانتیگراد) و ۲/۵ درصد در دمای ۵۰ درجه ی سانتیگراد است که بدلیل کم بودن مقدار تانیک اسید اکسید اضافه شده به ژلاتین - موسیلاژ است. میزان فنولیک نمونه ی ۱۰ درصد تانیک اسید اکسید در رده ی دوم بعد از کمپلکس حاوی ۵ درصد قرار دارد که نشان دهنده ی این است که احتمالاً بدلیل افزایش مقدار تانیک اسید اکسید در نمونه، تانیک اسید اکسید تمایل بیشتری برای دیمریزه شدن دارد و این مورد سبب کاهش اتصالات کووالانسی و هیدورژنی با کمپلکس می شود. با افزایش دما مقدار محتوای فنولیک در کمپلکس های حاوی غلظت های مختلف تانیک اسید اکسید کاهش می یابد که احتمالاً بدلیل ضعیف شدن پیوند های هیدورژنی و هیدروفوبی است.

محتوای فنولی نمونه ها در جدول ۳ نشان داده شده است. در بین کمپلکس ها با غلظت های مختلف تانیک اسید اکسید، OTA-5 در دمای ۳۰ و ۴۰ درجه سلسیوس بیشترین مقدار را داشت که نشان دهنده بیشتر بودن تعداد پیوندهای هیدروفوبی و کووالانسی بین تانیک اسید اکسید و ژلاتین - موسیلاژ و به عبارت دیگر درگیری موفقیت آمیز تانیک اسید اکسید در کمپلکس است. با این حال، محتوای فنولی OTA-10 کاهش یافته که می تواند به دلیل دیمریزه شدن فنول و کاهش اتصالات کووالانسی و هیدورژنی با کمپلکس باشد. کمترین میزان فنولیک نیز در نمونه های OTA-0.5 (دمای ۳۰، ۴۰ و ۵۰ درجه سلسیوس) و OTA-2.5 در دمای ۵۰ درجه سلسیوس گزارش شد که بدلیل کم بودن مقدار تانیک اسید اکسید اضافه شده به کمپلکس ژلاتین - موسیلاژ بود. با افزایش دمای واکنش ژلاتین و تانیک اسید اکسید، محتوای فنولی نمونه ها کاهش می یابد که احتمالاً بدلیل ضعیف شدن پیوند های هیدورژنی و هیدروفوبی است.

برای کاربردهای مختلفی از جمله محافظت از مواد غذایی حساس به تنش‌های اکسیداتیو و رهایش کنترل شده ترکیبات زیست فعال در سیستم‌های انتقال در صنایع غذایی مناسب باشد.

۵- منابع

- [1] Liu, F., Ma, C., Gao, Y. (2013). Food-grade covalent complexes and their application as nutraceutical delivery systems: A Review. *Comprehensive Review of Food Science and Food Safety*, 16, 76-95.
- [2] Ozdal, T., Capanoglu, E., Altay, F. A review on protein - phenolic interaction and associated changes. *Food Research International*, 51, 954-970.
- [3] Jin, B., Zhou, X., Zhou, S., Liu, Y., Guan, R., Zheng, Z., Liang, Y. (2019). Influence of phenolic acids on the storage and digestion stability of curcumin emulsions based on soy protein-pectin-phenolic acids ternary nano-complexes. *Journal of microencapsulation*, 36(7), 622-634.
- [4] Lee, D.S., Woo, J.Y., Je, J.Y. (2014). Chitosan-hydroxycinnamic acid conjugates: Preparation, antioxidant and antimicrobial activity. *Food Chemistry*, 148, 97-104.
- [5] Liu, F., Wang, D., Ma, C., Gao, Y. (2016). Conjugation of polyphenols prevents lactoferrin from thermal aggregation at neutral pH. *Food Hydrocolloids*, 58, 49-59.
- [6] Curcio, M., Parisi, O.I., Puoci, F., Altamari, I., Spizzirri, U.G., Picci, N. (2012). Antioxidant polymers by free radical grafting on natural polymers. In: Cirillo, G., Iemma, F., Eds. *Antioxidant polymers: synthesis, properties, and applications*. John Wiley & Sons: Hoboken, NJ; pp. 153-178.
- [7] Cao, Y., Xiong, Y.L. (2015). Chlorogenic acid - mediated gel formation of oxidatively stressed myofibrillar protein. *Food Chemistry*, 180, 235-43.
- [8] Anvari, M., Chung, D. (2016). Dynamic rheological and structural characterization of fish gelatin - gum Arabic coacervate gels cross-linked by tannic acid. *Food Hydrocolloids*, 60, 516-521.
- [9] Muhoza, B., Xia, S., Zhang, X. (2019). Gelatin and high methyl pectin coacervates crosslinked with tannic

۳-۲-۳- میکروسکوپ الکترونی روبشی

برای ارزیابی تأثیر افزودن تانیک اسید اکسید بر ریزساختار کمپلکس، SEM برای نمونه بدون تانیک اسید اکسید (شکل ۳-الف-۱) و نمونه OTA-5 (شکل ۳-الف-۲) در دمای ۳۰ درجه سلسیوس استفاده شد. واضح بود که در حضور تانیک اسید اکسید، ساختار بسته‌تر با تخلخل کمتری بود که ممکن است به دلیل اتصال عرضی تانیک اسید با کمپلکس ژلاتین-موسیلاژ بزرگ باشد. به طور مشابه، جین و همکاران (۲۰۱۹) مشاهده کردند افزودن فنولیک اسیدهایی چون فرولیک اسید، تانیک اسید و الاجیک اسید به کمپلکس پروتئین سویا- پکتین باعث تشکیل ماتریکس شبکه به هم پیوسته کروی شد و آن را به وابستگی اتصال زیاد فنولیک اسیدها برای ملحق شدن درون حفره‌های کمپلکس پروتئین سویا- پکتین و اتصال عرضی نزدیک آن‌ها مرتبط دانستند [۳]. در مطالعه‌ای دیگر توسط کوپاتنسیس و همکاران (۲۰۱۶)، گلیسرول و تانیک اسید برای اتصال عرضی با توده مرکب پروتئین شیر- کربوکسی متیل سلولوز استفاده شدند. با افزودن گلیسرول ساختار پلاستیک بیشتری با تخلخل کم بدست آمد در حالی که بافت پودری نرم با استفاده از تانیک اسید حاصل شد [۱۴]. گومز-ماسکاراک و همکاران (۲۰۱۹) گزارش کردند که کپسول ژلاتین-۱-کاراگینان بارگذاری شده با تانیک اسید نسبت به نمونه‌های بارگذاری شده با ترکیبات فنولی با وزن مولکولی پایین‌تر (گالیک اسید، کاتچین و کلروژنیک اسید) دارای سطح سفت‌تری است [۲۹].

۴- نتیجه گیری

در این مطالعه، کمپلکس سه گانه ژلاتین- تانیک اسید اکسید- موسیلاژ بزرگ با موفقیت تهیه شد. pH قلیایی (۹) که در آن ابتدا تانیک اسید اکسید با ژلاتین پیوند عرضی داده و پس از آن در pH اسیدی (۵/۵) موسیلاژ بزرگ به اضافه شد، بهترین شرایط برای تشکیل کمپلکس است. غلظت مطلوب تانیک اسید اکسید و دمای واکنش ژلاتین با تانیک اسید اکسید به ترتیب ۵ درصد و ۳۰ درجه سلسیوس بود. این کمپلکس که از محتوای فنولی بالایی و حلالیت کمی داشت، می‌تواند

- Linrong, Y. (2004). Microencapsulation of capsaicin by the complex coacervation of gelatin, Acacia and tannins. *Journal of Applied Polymer Science*, 91, 2669-2675.
- [21] Hadad, S., Goli, S.A.H. (2018). Fabrication and characterization of electrospun nanofibers using flaxseed (*Linum usitatissimum*) mucilage. *International Journal of Biological Macromolecules*, 114, 408-414.
- [22] Pena, C., Caba, K., Eceiza, A., Ruseckaite, R., Mondragon, I. (2010). Enhancing water repellence and mechanical properties of gelatin films by tannin addition. *Bioresource Technology*, 101, 6836-6842.
- [23] Wang, B., Adhikari, B., Bandrow, C. (2014). Optimisation of the microencapsulation of tuna oil in gelatin – sodium hexametaphosphate using complex coacervation. *Food Chemistry*, 158, 358-365.
- [24] Glaucia, A., Bozza, F., Thomazini, M., Bolini, H., Trindade, C. (2013). Microencapsulation of aspartame by double emulsion followed by complex coacervation to provide protection and prolong sweetness. *Food Chemistry*, 139, 72-78.
- [25] Wu, J., Chen, S., Ge, S., Miao, J., Li, J., Zhang, Q. (2013). Preparation, properties and antioxidant activity of an active film from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) Skin gelatin incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids*, 32, 42-51.
- [26] Pavia, D., Lampman, G.M., Kriz, G.S., Vyvyan, J.R. (2009). Introduction to spectroscopy. *Brooks cole*, 381-417.
- [27] Prigent, S.V.E., Gruppen, H., Visser, A.J.W.G., Koningsveld, G.A.H.D., Alfons, G.J.V. (2003). Effects of non-covalent interactions with 5-o-caffeoylquinic acid (CGA) on the heat denaturation and solubility of globular proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5088-5950.
- [28] Ozdal, T., Yalcinkaya, I.E., Toydemir, G., Capanoglu, E. (2019). Polyphenol-Protein Interactions and Changes in Functional Properties and Digestibility. 566-577.
- [29] Gómez-Mascaraque, L.G., Martínez-Sanz, M., Fabra, M.J., López-Rubio, A. (2019). Development of gelatin-coated ι-carrageenan hydrogel capsules by electric field-aided extrusion. Impact of phenolic compounds on their performance. *Food hydrocolloids*, 90, 523-533.
- acid: The characterization, rheological properties, and application for peppermint oil microencapsulation. *Food Hydrocolloids*, 97, 105174.
- [10] Aewsiri, T., Benjakul, S., Visessanguan, W., Wierenga, P.A., Gruppen, H. (2010). Antioxidative activity and emulsifying properties of cuttlefish skin gelatin – tannic acid complex as influenced by types of interaction. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 712-720.
- [11] Payne, G.F., Kim, E., Cheng, Y., Wu, H.C., Ghodssi, R., Rubloff, G.W., Bentley, W.E. (2013). Accessing biology's toolbox for the mesoscale biofabrication of soft matter. *Soft Matter*, 9(26), 6019–6032.
- [12] McClements, D.J. (2006). Non-covalent interactions between proteins and polysaccharides. *Biotechnology Advances*, 24, 621-625.
- [13] Yang, Y., Anvari, M., Pan, C.H., Chung, D. (2012). Characterization of interactions between fish gelatin and gum Arabic in aqueous solutions. *Food Chemistry*, 135, 555-561.
- [14] Koupantsis, T., Pavlidou, E., Paraskevopoulou, A. (2016). Glycerol and tannic acid as applied in the preparation of milk proteins–CMC complex coacervates for flavor encapsulation. *Food Hydrocolloids*, 57, 62-71.
- [15] Zhang, Z., Pan, C.H., Chang, D. (2011). Tannic acid cross – linked gelatin – gum Arabic coacervate microspheres for sustained release of allyl isothiocyanate: characterization and in vitro release study. *Food Research International*, 44, 1000-1007.
- [16] Cole, C.G.B. (2000). Gelatin. In: Francis, F.J., Ed. *Encyclopedia of Food Science and Technology*. John Wiley & Sons: Hoboken, NJ; pp. 1183-1188.
- [17] Toledano, O., Magdassi, S. (1997). Formation of surface active gelatin by covalent attachment of hydrophobic chains. *Journal of Colloid Interface Science*, 193, 172-177.
- [18] Mazza, G., Biliaderis, G. (1989). Functional properties of flaxseed mucilage. *Journal of Food Science*, 54, 1302-1306.
- [19] Kaushik, P., Dowling, K., Barrow, C., Adhikari, B. (2015). Complex coacervation between flaxseed protein isolate and flaxseed gum. *Food Research International*, 72, 91-97.
- [20] Xing, F., Cheng, G., Xing, B.,

Characterization of tertiary conjugate of gelatin-flaxseed (*Linum usitatissimum*) mucilage-tannic acid

Mohseni, F. ¹, Goli, S. A. H. ^{2*}, Abdollahi, M. ³

1. Master student of Food Science and Technology, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran
2. Associated professor, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Iran
3. PhD student of Food Science and Technology, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

(Received: 2020/05/10 Accepted: 2020/08/22)

In this study, a tertiary conjugate of flaxseed mucilage (FM)-gelatin-oxidized tannic acid (OTA) at two acidic and alkali pHs was fabricated. The total amount of biopolymers and added OTA was 2% (w/w solution) and 5 % (of total biopolymers), respectively. Fourier transforms infrared spectroscopy and solid state UV-visible spectroscopy were applied to confirm the complex formation and volume, solubility and phenolic content of the complexes were determined. Then, the effect of OTA concentration (0.5, 2.5, 5 and 10%) and reaction temperature (30, 40 and 50 °C) of gelatin with OTA were also evaluated through scanning electron microscopy analysis, yield complex and colorimetry. It was found that the addition of OTA to gelatin solution at alkali pH created strong bonds and a stable complex. The water solubility of acid complex (6.1%) was higher than that of alkali sample (3.6%). The optimal condition, regarding to high phenolic content and low solubility, was 5% OTA and the reaction temperature of 30 °C. This complex, may be suitable to apply for various applications such as protection of sensitive food ingredients from oxidative stresses and controlled release of bioactive components in delivery systems in food industry.

Key Words: Oxidized tannic acid, Flaxseed mucilage, Gelatin, Tertiary complex, Solid state UV-visible spectroscopy

* Corresponding Author E-Mail Address: amirgoli@cc.iut.ac.ir