

بررسی تاثیر مانوپروتئین استخراج شده از مخمر کلویورومایسس مارکسیانوس بر شاخص‌های کیفی و پایداری امولسیون روغن در آب

جلال محمدزاده^۱، فریده طباطبایی یزدی^۲، سید علی مرتضوی^۳، رسول کدخدایی^۴، آرش کوچکی^۵

۱. دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد * نویسنده مسئول (jmohamadzadeh@yahoo.com)
۲. دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۳. استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۴. دانشیار گروه نانوفناوری مواد غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی، مشهد
۵. دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

چکیده

تاریخ دریافت: ۹۳/۰۱/۲۶
تاریخ پذیرش: ۹۳/۰۸/۰۷

واژه‌های کلیدی

امولسیون
رفتار جریان
مانوپروتئین
مخمر کلویورومایسس
مارکسیانوس

مانوپروتئین، با ساختاری متشکل از واحدهای مانوزیل متصل به پروتئین از دیواره سلولی مخمر کلویورومایسس مارکسیانوس استخراج و خالص‌سازی شد. پس از تعیین برخی از خصوصیات آن، به منظور بررسی تاثیر مانوپروتئین، (۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱، ۱/۲۵ و ۱/۵ درصد وزنی/حجمی) بر شاخص‌های کیفی و پایداری امولسیون در زمان‌های ۱، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ روز در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد، امولسیون به نسبت وزنی ۸۰:۲۰ (روغن/محلول امولسیفایری) با استفاده از فرآیند فراصوت تهیه گردید. نتایج حاکی از این بود که کشش سطحی و بین‌سطحی با افزایش غلظت از ۰/۲۵ تا ۱/۲۵ درصد بطور معنی‌داری کاهش یافت، اما بار الکتریکی سطحی روند افزایشی نشان داد. منحنی‌های توزیع اندازه قطرات برای همه نمونه‌ها، تک قله‌ای و تقریباً نرمال بود و در غلظت ۱/۲۵ درصد به صورت باریک با کمترین پهنا، دیده شد. نگهداری امولسیون در طول مدت چهار هفته، سبب افزایش معنی‌دار اندازه قطرات در نمونه‌های ۰/۲۵ تا ۱ درصد شد که در غلظت‌های بالاتر از ۱ درصد، معنی‌دار نبود. بررسی خصوصیات رئولوژیکی امولسیون‌ها نیز مشخص ساخت که افزایش غلظت، باعث کاهش شاخص رفتار جریان، افزایش ضریب قوام و گرانیوی ظاهری شده و نمونه‌ها رفتاری غیرنیوتنی و روان‌شونده با برش، را از خود نشان دادند.

مقدمه

چند هفته، چند ماه و یا چند سال)، تشکیل می‌دهند. امولسیون‌ها به شکل‌های روغن در آب، آب در روغن و یا گاهی چندگانه "روغن در آب در روغن" و یا "آب در روغن در آب" دیده می‌شوند که از بین آنها، امولسیون‌های روغن در آب، توجه بیشتری را به خود معطوف کرده‌اند (Dickinson., 2009; Dalgleish, 2004).

امولسیون‌ها سامانه‌هایی متشکل از دو مایع غیرقابل‌امتزاج بوده که یکی از مایع‌ها به صورت قطرات ریزی، در مایع دیگر، تعلیق شده است. این سامانه‌ها به لحاظ ترمودینامیکی ناپایدار بوده و معمولاً با اضافه کردن ترکیباتی به عنوان امولسیفایر یا پایدارکننده، امولسیون‌های پایدار سینتیک (به مدت

مخمر *کلویرومایسس مارکسیانوس*^۲ مخمر دیگری است که از نظر خویشاوندی وابسته به مخمر *ساکارومایسس سرویسیه* بوده و در قیاس با سایر منابع میکروبی، به لحاظ حجم بالای توده زیستی و سرعت رشد بالا می‌تواند منبع خوبی جهت استخراج بیومولسیفایر مانوپروتئین با راندمان بالا باشد. همچنین این امولسیفایر در مقایسه با منابع سنتزی به لحاظ طبیعی بودن محصول و تجزیه‌پذیری زیستی بالا، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد (Melani et al., 2010; Lukondeh et al., 2003).

تحقیقات پیشین نشان داده است که غلظت امولسیفایر می‌تواند بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی امولسیون‌های روغن در آب، تاثیر بسزایی داشته و تعیین حداقل غلظت امولسیفایر مورد نیاز جهت تشکیل یک امولسیون پایدار، حائز اهمیت است (Surch et al., 2006; Sun & Gunasekaran, 2009; Wang et al., 2010).

Amaral و همکاران (۲۰۰۸)، در بررسی خصوصیات بیومولسیفایر یانسان (ترکیبی از پروتئین-کربوهیدرات-چربی) تولید شده از مخمر *یاروویا لیپولیتیکا*^۳ کاهش کشش سطحی را تا ۴۵ میلی‌نیوتن بر متر، پتانسیل زتای ۳۵- میلی‌ولت و پایداری امولسیون را در حداقل غلظت ۰/۸۵ درصد وزنی- وزنی بیومولسیفایر، گزارش کردند. در پژوهش دیگری خصوصیات امولسیفایری پروتئین حاصل از سیب‌زمینی شیرین متأثر از غلظت‌های مختلف (۰/۱ تا ۲ درصد وزنی- حجمی) امولسیفایر را با اندازه‌گیری ویژگی‌های کیفی امولسیون در شرایط pH خنثی بررسی شد. نتایج، حاکی از ناپایداری امولسیون در غلظت‌های کمتر از ۱ درصد، به واسطه پدیده تجمع و انبوهش قطرات بود (Mu & Cuo, 2010).

با توجه به کمبود اطلاعات در رابطه با ویژگی‌های کیفی این بیومولسیفایر، در این تحقیق به مطالعه و شناخت برخی خواص امولسیون‌کنندگی مانوپروتئین (کشش سطحی و بین‌سطحی، پتانسیل زتا، اندازه توزیع و قطر قطرات، شاخص رونشینی و خصوصیات رئولوژیکی) به عنوان یک امولسیفایر طبیعی، در ایجاد

بیومولسیفایرها، به عنوان امولسیفایرهای طبیعی، ترکیبات فعال سطحی هستند که از منابع بیولوژیکی، معمولاً به صورت خارج سلولی یا متصل شده با سطح سلول، قابل استخراج می‌باشند. مانوپروتئین، به عنوان یک ترکیب گلیکوپروتئینی از اتصال‌های α ۱-۶ مانوزیل در رشته اصلی به همراه شاخه‌های جانبی الیگوساکارییدی در شکل‌های دی، تری و تترامر، با اتصال‌های α ۱-۲ و α ۱-۳ واحدهای مانوزیل، تشکیل شده است. شاخه اصلی مانوز، از طریق اتصالات کووالانسی محکم N آسپیل D گلوکز آمین به اسیدآمین‌ها آسپارژین رشته پروتئینی متصل شده و الیگومرهای غیرمنشعب جانبی مانوزیل نیز به واسطه گروه‌های هیدروکسیل سرین یا ترئونین، بطور مستقیم به پروتئین متصل شده‌اند. این پروتئین، به واسطه اتصال گروه‌های آبگریز به واحدهای قندی مانوز، به یک ترکیب آمفی‌فیلیک طبیعی، تبدیل شده و می‌تواند به عنوان امولسیفایر در تهیه سامانه‌های امولسیونی غذایی، دارویی و بهداشتی مورد استفاده واقع شود (Fonseca et al., 2008; Banat et al., 2000).

مانوپروتئین، برای اولین بار توسط Cameron و همکاران (۱۹۹۰) به عنوان یک بیومولسیفایر پلیمریک موثر، از دیواره سلولی مخمر *ساکارومایسس سرویسیه*^۱ استخراج و معرفی گردید. آنان راندمان بالاتر و عدم وجود مشکلات مربوط به جداسازی این بیومولسیفایر از محیط کشت، را نسبت به سایر بیومولسیفایرهای میکروبی نیز گزارش کردند. Dikite و همکاران (۲۰۱۰) مانوپروتئین را از مخمر *ساکارومایسس سرویسیه* KA01 توسط محلول بافری، در شرایط اتوکلاو، استخراج و با فرایند دیالیز در مقابل آب مقطر خالص‌سازی کردند؛ Liu و همکاران (۲۰۱۰) در بررسی روش‌های مختلف استخراج مانوپروتئین از دیواره سلولی مخمر *ساکارومایسس سرویسیه*، روش استخراج با آب داغ در محیط بافری و خالص‌سازی آن توسط محلول ستالون را، مناسب‌ترین روش با بیشترین اثر حفاظتی بر ساختمان مانوپروتئین گزارش کردند.

2- *Kluyveromyces marxianus*
3- *Yarrowia lipolytica*

1- *Saccharomyces cerevisiae*

فرمانتور و سرعت هم‌زن توسط پروب اکسیژن کنترل گردید (لازم به ذکر است شرایط تخمیر (pH، دما و هوادهی) و ترکیبات محیط کشت (غلظت‌های لاکتوز و عصاره مخمر) بر مبنای بالاترین راندمان تولید مانوپروتئین تنظیم شده که نتایج آن نشان داده نشده است).

استخراج و خالص‌سازی مانو-پروتئین

سلول‌های مخمر به وسیله سانتریفوژ محیط کشت محلول در شرایط $4500 \times g$ برای مدت ۱۰ دقیقه جدا شدند (سه مرتبه شستشو با آب سرد دیونیزه)؛ سپس سلول‌ها در حضور گوی‌های شیشه‌ای (۱۰ درصد وزنی- وزنی) با قطر $0/4$ میلی‌متر برای چند دوره به مدت ۲ دقیقه در یک دستگاه ورتکس رومیزی^۳ و محیط واسط یخ با بالاترین شدت مخلوط شدند. سوسپانسیون حاصل پس از جداسازی و شستشوی گوی‌های شیشه‌ای در $4500 \times g$ برای مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و رسوب حاصله چندین مرتبه با آب سرد دیونیزه شستشو داده شد (Liu et al., 2009).

رسوب حاوی دیواره سلولی (۲۰ درصد وزنی- وزنی) در محلول بافر، $0/1$ مولار سیترات پتاسیم و $0/2$ مولار متابی‌سولفیت پتاسیم در $pH = 7$ به مدت ۹۰ دقیقه اتوکلاو گذاری شد. مانوپروتئین محلول حاصل پس از سانتریفوژ ($2500 \times g$) به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ) به وسیله سه حجم اتانول اسیدی (۱ درصد اسید استیک در اتانول ۹۶ درصد) رسوب داده شد. جهت کامل شدن رسوب، نمونه به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس در $8000 \times g$ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید (Liu et al., 2009; Araújo et al., 2013). از ستاولون (هگزادسی‌تری متیل آمونیم بروماید) به عنوان یک حلال آلی برای رسوب انتخابی و خالص‌سازی بیوامولسیفایر مانان از دیگر ماکرومولکول‌ها استفاده شد. جهت خلوص بیشتر، رسوب حاصل در مقابل آب مقطر به مدت ۴۸ ساعت دیالیز و سپس با خشک‌کن انجمادی خشک گردید (Dikit et al., 2010; Lukondeh et al., 2003).

و پایداری امولسیون‌های روغن در آب تحت تاثیر غلظت امولسیفایر و تعیین پایداری آن در طول زمان پرداخته شد تا اطلاعات پایه و اساسی جهت کاربرد این بیوامولسیفایر در مواد غذایی به دست آید.

مواد و روش‌ها

مخمر کلویورومایس مارکسیانوس (PTCC:5194, CBS 6432) به صورت لیوفیلیزه از مرکز منطقه‌ای کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران، تهیه و فعال‌سازی شد. پودر آب‌پنیر مورد استفاده، از کارخانه شیر خشک مولتی مشهد، محیط کشت‌ها و مواد شیمیایی مصرفی نیز از شرکت‌های مرک^۱ و شارلو^۲ تهیه شدند.

تهیه مایه تلقیح

مایه تلقیح در یک ارلن مایر فلاسک ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط تلقیح (۵ درصد لاکتوز، ۰/۳ درصد عصاره مخمر و ۰/۵ درصد پپتون در آب مقطر) تهیه و سپس در اینکوباتور شیکردار با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در دور ثابت ۱۵۰ دور در دقیقه به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. (Aktas et al., 2008).

محیط کشت تخمیر

محیط اصلی کشت در یک سامانه فرمانتور غیرمداوم، EYELA Jar Fermenter, Model. MBF-) (800, Tokyo, Japan) محتوی ۳ لیتر محیط کشت، بر پایه استفاده از پودر آب‌پنیر (لاکتوز با غلظت ۵۲/۶ گرم بر لیتر و عصاره مخمر در غلظت ۱۰/۳۸ گرم بر لیتر) و ترکیبات مغذی دیگری (KH_2PO_4 ۳ گرم بر لیتر؛ $(NH_4)_2SO_4$ ۱ گرم بر لیتر؛ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ۰/۵ گرم بر لیتر؛ $CaCl_2$ ۰/۱۳ گرم بر لیتر؛ $NaCl$ ۰/۲۰ گرم بر لیتر) انجام شد (Aktas et al., 2008). در طول تخمیر، pH محیط به وسیله NaOH و HCl یک نرمال در pH برابر ۵/۴ و دما نیز در ۳۱/۹ درجه سانتی‌گراد، تنظیم شد. اکسیژن محلول مناسب در سطح ۵۰ درصد با تنظیم سرعت حجمی هوای ورودی به مخزن

1- Merck
2- Scharlau

کشش سطحی و بین سطحی محلول‌ها با غلظت‌های مختلف بیومولسیفایر، توسط دستگاه تنسیومتر (مدل K-۱۰۰) و به روش حلقه دونوی^۳ در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد. به منظور تعیین کشش بین‌سطحی، از روغن ذرت مازولا و زمان تعادل ۳۰ دقیقه استفاده شد (Huang et al., 2001).

اندازه‌گیری توزیع اندازه قطرات

متوسط قطر و توزیع اندازه قطرات امولسیون با کمک دستگاه سنجش اندازه ذرات (مدل Fritsch Analysette 22، ساخت کشور آلمان) در زمان تولید و فواصل زمانی ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ روز پس از تولید اندازه‌گیری شد:

$$D_{32} = \frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i d_i^2} \quad \text{رابطه (۱)}$$

در عبارت فوق، D_{32} متوسط قطر قطرات و n_i تعداد قطرات با قطر d_i می‌باشند.

برای مقایسه درجه یکنواختی اندازه ذرات از شاخصی به نام عدد اسپان (پهنای توزیع اندازه ذرات) از رابطه ذیل استفاده شد:

$$\text{Span} = \frac{[d(v,90) - d(v,10)]}{d(v,50)} \quad \text{رابطه (۲)}$$

در این رابطه (۹۰، ۱۰) $d(v,90)$ ، (۱۰، ۹۰) $d(v,10)$ و به ترتیب قطر متوسط ۹۰، ۱۰ و ۵۰ درصد قطرات می‌باشند.

اندازه‌گیری شاخص پتانسیل زتا

پتانسیل زتای امولسیون‌ها با استفاده از دستگاه DLS نانوسایزر (سری ZS، شرکت مالورن انگلستان) بر مبنای سنجش جابجایی الکتروفوریتیک ذرات و استفاده از قانون هنری اندازه‌گیری شد. دستگاه دارای یک سل لوله موئین بود که در دو انتهای آن الکترودهایی از جنس پلاتینیوم قرار گرفته و پتانسیل به دو سر این الکترودها اعمال می‌شد. ذرات محلول با سرعت معینی به سمت الکترودهای با بار مخالف حرکت کرده که این سرعت توسط دستگاه به پتانسیل زتا تبدیل می‌شد.

اندازه‌گیری روشینی

تعیین جرم مولکولی به روش کروماتوگرافی نفوذ ژل^۱ کروماتوگرافی با شرایط ماده استاندارد پلی‌اتیلن‌گلایکول، فاز متحرک آب، سرعت جریان ۱ میلی‌متر بر دقیقه و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در یک دستگاه کروماتوگرافی نفوذ ژل مدل شیمادزو ۶-A، مجهز به آشکارساز ضریب شکست^۲ و ستون مدل (Waters Ultrahydrogel 250 / 7.8 * 300 mm) انجام شد (Zhao et al., 2000).

تعیین میزان کربوهیدرات کل و پروتئین

برای اندازه‌گیری کربوهیدرات کل، از روش فنل-اسید سولفوریک و اندازه‌گیری جذب رنگ زرد-نارنجی توسط اسپکتروفتومتر در ۴۹۰ نانومتر استفاده شد (Dubios, 1956). اندازه‌گیری پروتئین با استفاده از روش میکروکلدال انجام شد (AOAC, 2005).

تهیه امولسیون

فاز آبی با حل نمودن مقادیر مختلف بیومولسیفایر (۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱، ۱/۲۵ و ۱/۵ درصد وزنی/وزنی) در بافر برابر ۷ (افزودن امولسیفایر سبب کاهش pH می‌شد) به همراه سدیم آزاید (۰/۰۲ درصد) به عنوان یک ماده ضد میکروبی مدت ۲ ساعت توسط یک همزن مغناطیسی مخلوط گردید. محلول‌های حاصل به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شدند تا جذب کامل آب انجام پذیرد. امولسیون اولیه به نسبت ۸۰:۲۰ محلول‌های امولسیفایر و روغن ذرت با استفاده از همگن‌ساز اولتراتوراکس (IKA T50، آلمان) با سرعت ۹۶۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳ دقیقه تحت دمای اتاق انجام شد. برای همگن‌سازی ثانویه از امواج فراصوت، (اولتراسوند ساخت شرکت Sonix، کشور آمریکا) به مدت ۵ دقیقه و فرکانس ۲۰ کیلوهرتز در بیشینه توان اسمی دستگاه (۷۵۰ وات) و سونوتروود استوانه‌ای شکلی از جنس تیتانیوم به قطر ۱۹ میلی‌متر استفاده شد. دمای امولسیون از طریق گردش آب در جداره مخزن در ۲۰ درجه سانتی‌گراد حفظ گردید.

تعیین کشش سطحی و بین سطحی

1- Gel-Permeation chromatography
2- Refractive index detector

میانگین و انحراف معیار کلیه آزمایشات، حاصل سه تکرار در هر نمونه بوده و داده‌های حاصل از اعمال تیمارها، در قالب طرح کاملاً تصادفی با بررسی اثر میانگین داده‌ها از طریق آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح ۹۵ درصد توسط نرم افزار آماری Minitab 16 صورت گرفت.

نتایج و بحث

مشخصات بیومولسیفایر مانوپروتئین

میزان برخی خصوصیات مانوپروتئین استخراجی از دیواره سلولی مخمر کلویورومایسس مارکسیانوس در جدول ۱ خلاصه شده است. نتایج کروماتوگرافی نفوذ ژل، جرم مولکولی مانوپروتئین را ۱۰۴/۴۱ کیلودالتون نشان داد که نسبت به سایر بیومولسیفایرهای پلی‌مریک من جمله لیپوزان (۵۷/۶ کیلودالتون) از جرم مولکولی بالاتری برخوردار است. Liu و همکاران (۲۰۰۸)، خصوصیات مانوپروتئین‌ها را بسیار متغیرپذیر دانستند و خاطر نشان کردند با توجه به نوع میکروارگانیسم، شرایط و ترکیبات کشت و روش استخراج، مانوپروتئین‌ها می‌توانند ۷۰ تا ۹۰ درصد کربوهیدرات، ۱۰ تا ۳۰ درصد پروتئین و جرم مولکولی در دامنه ۶۵ تا ۱۸۰ کیلودالتون داشته باشند. Dikit و همکاران (۲۰۱۰) جرم مولکولی مانوپروتئین استخراجی از مخمر ساکارومایسس سرویسبه KA01 را ۷۶ کیلودالتون و مقدار پروتئین و کربوهیدرات آن را به ترتیب ۳۲ و ۶۸ درصد گزارش کردند. بنابراین اختلافات مشاهده در مشخصات مانوپروتئین حاصل از این تحقیق، با نتایج قبلی می‌تواند ناشی از تاثیر عوامل فوق باشد.

پس از تولید امولسیون، ۱۰ میلی‌لیتر از نمونه درون لوله‌های آزمایش ریخته و درب آن بسته شد و در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۸ روز نگهداری شد. شاخص رونشینی امولسیون پس از ۱، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ روز تولید اندازه‌گیری شد. شاخص رونشینی از طریق فرمول ذیل محاسبه شد (Wang et al., 2010).

$$CI = \frac{HS}{HE} \times 100 \quad \text{رابطه (۳)}$$

در این رابطه (HE) و (HS) به ترتیب ارتفاع کل امولسیون و ارتفاع سرم می‌باشند (در طی نگهداری، نمونه‌ها به دو فاز، خامه در بالا و فاز سرم در پایین تبدیل شدند).

سنجش گرانروی و ویژگی‌های رئولوژیکی

اندازه‌گیری خصوصیات رئولوژیکی امولسیون با غلظت‌های مختلف بیومولسیفایر، بلافاصله بعد از تهیه و در طی نگهداری با استفاده از گرانروی سنج چرخشی بروکفیلد (مدل DV-III Ultra، آمریکا) در دامنه درجه برش ۱ تا ۱۰۰ (بر ثانیه) در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد. در هر مرحله حجم امولسیون ثابت و اسپیندل ULA با عمق مشخص در نمونه قرار گرفت. نمونه‌ها به ترتیب از سرعت‌های کم به زیاد، تحت تنش قرار گرفتند. سرعت برش با توجه به دستورالعمل سازنده دستگاه و رفتار جریان نیز از طریق برازش مدل قانون توان بر داده‌های آزمون (تنش برش - سرعت برش) محاسبه شد.

تحلیل آماری

جدول ۱- برخی خصوصیات بیومولسیفایر مانوپروتئین مخمر کلویورومایسس مارکسیانوس

| میزان (درصد وزنی - وزنی) | خصوصیات |
|--------------------------|--------------------------|
| ۶۸/۲۲ ± ۱/۹۸ | کربوهیدرات کل |
| ۲۸/۸ ± ۰/۵ | پروتئین |
| ناچیز | چربی |
| ۲/۸۴ ± ۰/۲۵ | خاکستر |
| ۱۰۴/۴۱ ± ۲/۲۵ | جرم مولکولی (کیلودالتون) |

کشش سطحی و بین سطحی

میزان کاهش کشش سطحی و بین سطحی متاثر از غلظت‌های مختلف مانوپروتئین نشان داد، با افزایش غلظت بیومولسیفایر تا ۱ درصد، کشش سطحی و بین سطحی کاهش یافت و غلظت‌های بالاتر بیومولسیفایر اثر معنی‌داری بر میزان کاهش کشش سطحی و بین سطحی نداشت.

بالاترین میزان کاهش کشش بین سطحی در غلظت ۱/۲۵ درصد مانوپروتئین با مقدار عددی ۲/۳۸۲ میلی‌نیوتن بر متر به دست آمد که با نقطه بحرانی غلظت میسل برابر بود. به نظر می‌رسد نوآرایی ساختار و آرایش فضایی بین سطحی مولکول‌های مانوپروتئین در هنگام قرار گرفتن در سطح مشترک آب و روغن سبب جذب مناسب و سهولت جهت‌گیری گروه‌های آب‌دوست و آب‌گریز در سطح مشترک دوفاز و کاهش کشش سطحی و بین سطحی به ترتیب تا ۴۶/۶۹۴ و ۲/۳۸۲ میلی‌نیوتن بر متر شده است. Surch و همکاران (۲۰۰۶) کشش سطحی و بین سطحی پروتئین غلیظ شده آب‌پنیر را در غلظت یک درصد به ترتیب ۴۵/۶۱۳ و ۱/۳۲۷ گزارش کردند که به نظر می‌رسد، این اختلاف مربوط به جرم مولکولی کمتر و آرایش فضایی بین سطحی مولکول‌های پروتئین غلیظ شده آب‌پنیر نسبت به مانوپروتئین باشد. تغییرات کشش سطحی و بین سطحی در واقع معیاری از تمایل و توانایی یک امولسیفایر در فضای بین سطحی است و معمولاً تمایل به تطبیق با آرایش بین سطحی دارند که انرژی آزاد سیستم در آن موقعیت حداقل باشد و هر چه میزان جذب آن در سطح مشترک دوفاز بیشتر باشد، انرژی آزاد و متعاقب آن کشش سطحی و بین سطحی به میزان زیادتری کاهش پیدا می‌کند. علاوه بر این، فعالیت سطحی امولسیفایرها می‌تواند بر اساس سطح هیدروفوبیک، خصوصیات الکتریکی، جرم مولکولی، ظرفیت انعطاف‌پذیری و نحوه آرایش بین سطحی آنها متفاوت باشد (McClements, 2005; *et al.*, 2001). (Huang

Amaral و همکاران (۲۰۰۸) تغییرات کشش سطحی و بین سطحی بیومولسیفایر یانسان^۱ را به ترتیب تا ۴۵ و ۱/۵ میلی‌نیوتن بر متر گزارش کردند. به نظر می‌رسد، این اختلاف می‌تواند مربوط به جرم مولکولی کمتر (۷۸/۵ کیلودالتون در مقابل ۱۰۴/۴۱ کیلودالتون) و در نتیجه افزایش تراکم‌پذیری و زیاد شدن تعداد آنها در فصل مشترک آب و روغن، میزان سطح هیدروفوبیک و خصوصیات الکتریکی مولکول‌های بیومولسیفایر یانسان نسبت به مانوپروتئین باشد.

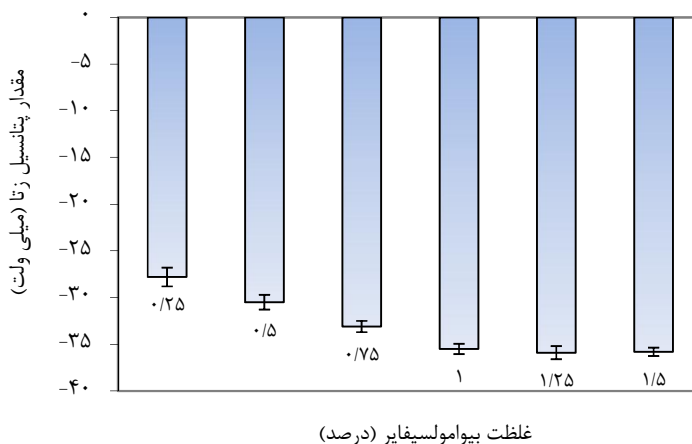
پتانسیل زتا

همانطور که در شکل ۱ ملاحظه می‌گردد، امولسیون حاصل از مانوپروتئین، از نظر الکتریکی در pH برابر ۷، دارای بار منفی بود. مقدار پتانسیل زتا در غلظت‌های مختلف بیومولسیفایر در دامنه ۲۸/۷- تا ۳۵/۹- تغییر کرد. پتانسیل زتا، در واقع شاخصی از بار الکتریکی سطح قطرات و پایداری بالقوه سیستم‌های امولسیونی است. چنانچه همه قطرات در امولسیون دارای پتانسیل زتای منفی یا مثبت بزرگ باشند، تمایل به دفع یکدیگر داشته و به هم نزدیک نمی‌شوند و اگر پتانسیل زتا کمتر از حدی باشد که نیروی دافعه الکترواستاتیکی نتواند بر نیروی جاذبه واندروالسی بین قطرات غلبه کند، در صورت عدم وجود نیروی دافعه فضایی تجمع و درهم‌آمیختن قطرات صورت می‌گیرد (McClement, 2004).

جدول ۲- میزان کشتش سطحی و بین سطحی (روغن ذرت-آب) در غلظت های مختلف بیومولسیفایر مانوپروتئین

| غلظت بیومولسیفایر (درصد) | کشتش سطحی (میلی نیوتن بر متر) | کشتش بین سطحی (میلی نیوتن بر متر) |
|--------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| ۰/۲۵ | ۵۲/۰۵۷±۰/۱۹۱ ^{۴*} | ۱۲/۸۴۲±۰/۳۱۷ ^f |
| ۰/۵ | ۵۰/۹۵۶±۰/۱۱۴ ^{cd} | ۹/۲۹۱±۰/۲۱۳ ^d |
| ۰/۷۵ | ۴۹/۰۶۹±۰/۱۴۵ ^c | ۵/۸۷۱±۰/۱۹۴ ^c |
| ۱ | ۴۷/۰۵۴±۰/۱۷۶ ^b | ۲/۶۸۱±۰/۱۸۹ ^b |
| ۱/۲۵ | ۴۶/۶۹۴±۰/۱۳۴ ^a | ۲/۳۸۲±۰/۱۶۱ ^a |
| ۱/۵ | ۴۶/۷۰۱±۰/۱۸۴ ^a | ۲/۳۸۵±۰/۲۱۲ ^a |

*نتایج در هر ستون با حروف غیر مشابه، دارای اختلاف آماری معنی دار ($P < 0.05$) می باشند.



شکل ۱- مقدار میانگین پتانسیل زتا در غلظت های مختلف بیومولسیفایر

الکترولیت های فاز آبی احاطه کننده قطرات نیز، تاثیر بسزایی در بارالکتریکی امولسیون دارد.

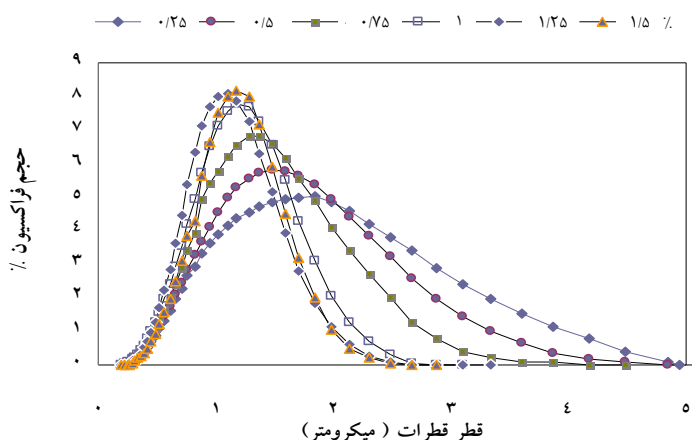
اندازه قطرات امولسیون

یکی از روش های بررسی پایداری و تعیین برهم کنش بین اجزای امولسیون ها، تعیین اندازه و توزیع اندازه قطرات آن می باشد؛ بطوری که روند کلیه مکانیسم های ناپایداری مانند انبوهش، درهم آمیختن و همچنین صفات ظاهری و رئولوژی امولسیون را می تواند تحت تاثیر قرار دهد. شکل ۲ تغییرات توزیع اندازه قطرات نمونه های امولسیون را در غلظت های مختلف مانوپروتئین نشان می دهد. تمامی امولسیون ها دارای منحنی توزیع اندازه تک قله ای و به صورت نرمال بودند. با این حال پهنای منحنی ها با هم

با افزایش غلظت مانوپروتئین، مقدار پتانسیل زتا افزایش یافت که نشان دهنده جذب بیشتر مانوپروتئین بر سطح قطرات و افزایش بار منفی در اطراف سطح می باشد. در محدوده غلظتی ۱ تا ۱/۵ درصد با افزایش غلظت، اختلاف معنی داری بین مقادیر مختلف پتانسیل زتا ملاحظه نشد. این نتیجه به این معنی است که افزایش پوشاندگی مانوپروتئین بر قطرات روغن، در دامنه مذکور، تاثیر معنی داری در افزایش پتانسیل زتا نداشته است. تاثیر غلظت امولسیفایر بر پتانسیل زتا توسط Wang و همکاران (۲۰۱۰) نیز گزارش شده که تاییدی بر این نتایج است. علاوه بر این Chubert و Kulmyrzaev (۲۰۰۴) نشان دادند، درجه یونیزاسیون گروه های آمینی و کربوکسیلی مولکول های جذب شده، pH و غلظت

با پراکندگی حداقل است. اصولاً کاهش پهنای منحنی توزیع اندازه قطرات به معنای کوچک بودن دامنه قطر قطرات و از شاخص‌های مهم در تعیین پایداری امولسیون می‌باشد.

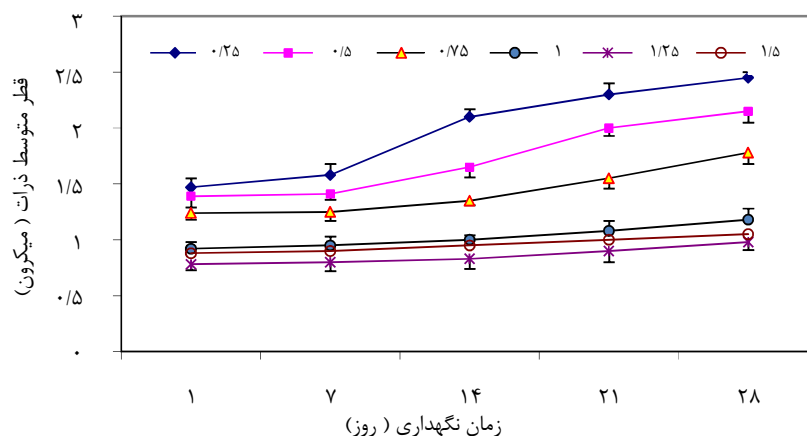
متفاوت بود و بیشترین گستردگی در منحنی‌های مربوط به غلظت‌های پایین ۱ درصد بود که موید پراکندگی وسیع‌تر اندازه قطرات می‌باشد. در غلظت‌های ۱ درصد و بالاتر، منحنی توزیع اندازه قطرات باریک و تیز بود که نشان‌دهنده قطرات ریزتر



شکل ۲- منحنی توزیع اندازه قطرات امولسیون‌های حاوی مقادیر مختلف مانوپروتئین

مانع از جذب قطرات بواسطه نیروهای جاذبه واندروالسی و یا هیدروفوبی شود. بنابراین قطرات با یکدیگر برخورد کرده و منجر به تشکیل قطرات بزرگتر و درهم‌آمیختن آنها می‌گردد. در غلظت‌های بالاتر، پوشانندگی بیشتر و کامل سطح قطرات توسط امولسیفایر و ضخامت بیشتر لایه بین‌سطحی، مانع از درهم‌آمیختگی قطرات شده و در نتیجه اندازه آنها کاهش یافته است.

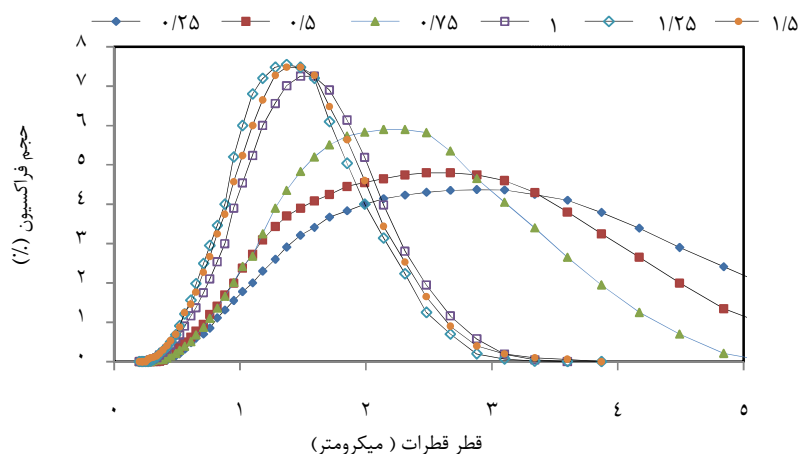
مقایسه میانگین‌ها نشان داد، با افزایش غلظت مانوپروتئین، اندازه متوسط قطر قطرات بطور معنی‌داری کاهش یافت و کمترین اندازه قطره در غلظت ۱/۲۵ درصد به دست آمد. به نظر می‌رسد در غلظت‌های پایین، پوشانندگی و میزان مانوپروتئین بین‌سطحی قطرات، کم است و نیروهای دافعه الکترواستاتیکی و فضایی به اندازه‌ای نیست که بتواند



شکل ۳- متوسط قطر قطرات امولسیون در غلظت‌های مختلف مانوپروتئین طی زمان نگهداری

نتایج این تحقیق می‌باشد. بررسی پایداری امولسیون در طی چهار هفته نگهداری نشان داد، منحنی توزیع اندازه قطرات امولسیون‌های با غلظت ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ درصد، به سمت راست تغییر مکان دادند. این امر بدین معنی است که قطرات با اندازه بزرگ‌تر و پراکندگی بیشتر، در این نمونه‌ها افزایش یافته است که می‌تواند ناشی از کافی نبودن مقدار مانوپروتئین در سطح بین دو فاز امولسیون باشد. در حالی که در غلظت‌های ۱ درصد و بالاتر، هیچ تغییر معنی‌داری در منحنی توزیع اندازه ذرات، تا پایان زمان نگهداری رخ نداد و فقط کمی کوتاه‌تر شدند (شکل ۴).

پس از چهار هفته نگهداری، قطر متوسط قطرات امولسیون‌هایی که با غلظت‌های ۰/۲۵ تا ۰/۷۵ درصد مانوپروتئین تهیه شده بود، بطور چشم‌گیری افزایش یافت و در غلظت‌های ۱ تا ۱/۵ درصد تغییر معنی‌داری در قطر متوسط قطرات در طی نگهداری مشاهده نشد. به طور کلی افزایش قطر متوسط قطرات در غلظت‌های کمتر از ۱ درصد، در طی نگهداری می‌تواند نشان دهنده پدیده درهم‌آمیختگی قطرات باشد. نتایج تحقیقات Surch و همکاران (۲۰۰۶) و Guo و Mu (۲۰۱۰) بر تاثیر غلظت امولسیفایر پروتئین آب‌پنیر و پروتئین سیب‌زمینی شیرین بر اندازه قطرات و منحنی توزیع اندازه، آنها تاییدی بر



شکل ۴- منحنی توزیع اندازه قطرات امولسیون‌های حاوی مقادیر مختلف مانوپروتئین پس از چهار هفته نگهداری

مدام جذب سطح روغن شده و قطرات کوچک می‌گردند. اما قطرات در غلظت ۱/۵ درصد، کمی بزرگتر شده که می‌تواند ناشی از افزایش گرانشی باشد. افزایش گرانشی در غلظت‌های بالاتر و ثابت بودن انرژی ورودی، و همچنین انبوهش ناشی از تهی شدن، می‌تواند در این افزایش اندازه، موثر باشند؛ Chanamai و McClements (۲۰۰۴) نیز افزایش قطر قطرات را در غلظت‌های بالای ۱/۵ درصد پروتئین غلیظ شده آب‌پنیر و صمغ عربی گزارش کردند.

همچنین در غلظت‌های بالاتر از ۱ درصد، تغییرات عدد اسپان در طول زمان نگهداری از نظر آماری معنی‌دار نبود. تاثیر غلظت بیوامولسیفایر مورد بررسی بر عدد اسپان (پهنای توزیع اندازه ذرات) قطرات، نیز کاملاً معنی‌دار بود. نتایج حاکی از آن است با افزایش غلظت، مقدار عددی اسپان بطور معنی‌داری کاهش یافت که نشان‌دهنده افزایش درجه یکنواختی اندازه قطرات می‌باشد. افزایش غلظت تا ۱/۲۵ درصد، سبب کاهش اندازه قطرات شده به عبارت دیگر، مانوپروتئین

جدول ۳- عدد اسپان منحنی توزیع اندازه ذرات نمونه‌های مختلف امولسیون در طی نگهداری

| غلظت (درصد) | | | | | | |
|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------|
| ۱/۵ | ۱/۲۵ | ۱ | ۰/۷۵ | ۰/۵ | ۰/۲۵ | زمان نگهداری (روز) |
| ^a ۰/۹۴±۰/۰۲ | ^a ۰/۹۳±۰/۰۳ | ^a ۰/۹۷±۰/۰۲ | ^{ab} ۱/۲۲±۰/۰۳ | ^b ۱/۳۷±۰/۰۲ | ^{c*} ۱/۴۸±۰/۰۲ | ۱ |
| ^a ۰/۹۵±۰/۰۲ | ^a ۰/۹۲±۰/۰۲ | ^a ۰/۹۸±۰/۰۲ | ^{ab} ۱/۲۵±۰/۰۲ | ^{cd} ۱/۵۸±۰/۰۳ | ^{fg} ۱/۹۷±۰/۰۳ | ۷ |
| ^a ۱/۱±۰/۰۴ | ^a ۱/۰±۰/۰۳ | ^{ab} ۱/۱۶±۰/۰۳ | ^c ۱/۵۲±۰/۰۵ | ^f ۱/۸۸±۰/۰۲ | ^{hg} ۲/۳۳±۰/۰۵ | ۱۴ |
| ^a ۱/۲۲±۰/۰۲ | ^a ۱/۱۵±۰/۰۳ | ^{ab} ۱/۲۸±۰/۰۲ | ^{cd} ۱/۵۵±۰/۰۳ | ^g ۲/۱۸±۰/۰۲ | ^h ۲/۴۵±۰/۰۲ | ۲۱ |
| ^b ۱/۳۲±۰/۰۳ | ^{ab} ۱/۲۵±۰/۰۴ | ^{bc} ۱/۳۵±۰/۰۴ | ^d ۱/۶±۰/۰۲ | ^h ۲/۴۴±۰/۰۴ | ⁱ ۲/۵۳±۰/۰۵ | ۲۸ |

*نتایج در هر ستون با حروف غیرمشابه، دارای اختلاف آماری معنی‌دار ($P < 0.05$) می‌باشند.

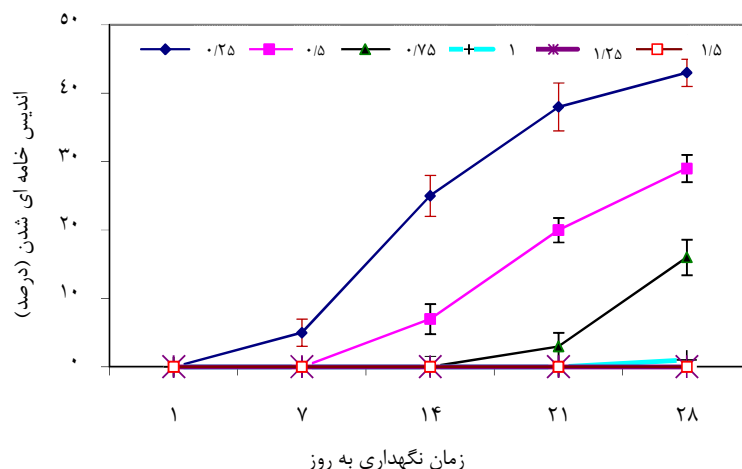
اندازه‌گیری شاخص روشنی

هیدروفیل بخش کربوهیدرات مانوپروتئین در فاز آبی، نیز می‌تواند نقش مهمی را در پایداری امولسیون حاصله نسبت به تجمع و انبوهش قطرات داشته باشد. به عبارت دیگر، می‌توان گفت، موقعیت مانوپروتئین در سطح مشترک آب و روغن، به گونه‌ای است که گروه هیدروفیل کربوهیدرات آن، در فاز آبی قرار گرفته و باعث ایجاد نیروی دافعه فضایی می‌شود. Tokle و همکاران (۲۰۱۲) نیز در بررسی لاکتوفرین به عنوان یک ترکیب گلیکوپروتئینی، پایداری بالای آن را در طول نگهداری، به ترکیب دو نیروی دافعه الکترواستاتیکی و فضایی حاصل از بخش کربوهیدرات آن، نسبت دادند.

در امولسیون حاوی غلظت‌های پایین (۰/۲۵ و ۰/۵ و ۰/۷۵ درصد)، یک خط مرزی، پس از چهار هفته نگهداری مشاهده شد و روشنی به طور آشکاری به همراه فاز سرم قابل تشخیص بود. نتایج افزایش پهنای توزیع اندازه ذرات، (جدول ۲) و تصاویر ریزساختار امولسیون‌ها (نتایج نشان داده نشده است) حاکی از آن بود که علاوه بر پدیده انبوهش، درهم‌آمیختگی قطرات نیز، صورت گرفته است.

تغییرات شاخص روشنی در برابر زمان نگهداری، نشان داد این شاخص در نمونه‌های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ درصد به میزان ۴۳، ۲۹ و ۱۶ درصد در طی ۲۸ روز رسیده است (شکل ۵). در نمونه ۱ درصد به مقدار جزئی (حدود ۳ درصد) و در نمونه‌های ۱/۲۵ و ۱/۵ درصد، پدیده روشنی مشاهده نگردید. در غلظت‌های پایین، احتمالاً با گذشت زمان در اثر افزایش برخورد (قطره- قطره، توده- قطره و توده- توده) و حرکات براونی، انبوهش قطرات افزایش یافته و طبق قانون استوکس، با توجه به افزایش اندازه شعاع قطرات، سرعت روشنی بیشتر شده است (McClement, 2005)

به نظر می‌رسد، مکانیسم اصلی پایداری امولسیون‌های تهیه شده با مانوپروتئین، در غلظت ۱/۲۵ درصد مربوط به افزایش پتانسیل زتا در سطح باشد که موجب جلوگیری از تجمع و افزایش اندازه قطرات و در نتیجه جلوگیری از افزایش جدایی فازها و روشنی می‌شود. همچنین لازم به ذکر است در غلظت مذکور، اثر ترکیبی دو نیروی دافعه الکترواستاتیکی و ممانعت فضایی، ناشی از گروه



شکل ۵- اثر غلظت‌های مختلف مانوپروتئین بر اندیس روشنی در طی نگهداری

خصوصیات رئولوژی امولسیون

به منظور بررسی تاثیر غلظت مانوپروتئین بر رفتار جریان امولسیون، ضریب قوام (k) و شاخص رفتار جریان (n) نمونه‌ها، از برازش مدل قانون توان، بر داده‌های تنش برشی در برابر سرعت برشی استفاده شد (ضریب تعیین برازش داده‌های تنش برشی در مقابل سرعت برشی تمام نمونه‌ها، بالاتر از ۰/۹۹ بود). افزایش غلظت مانوپروتئین، باعث افزایش گرانروی امولسیون شده که می‌تواند ناشی از کاهش اندازه قطرات و افزایش میزان تراکم در واحد حجم و کاهش سرعت حرکت قطرات باشد. همچنین حضور مقادیر بالاتر مانوپروتئین و افزایش بخش هیدروفیل آن، باعث افزایش ظرفیت اتصال آب به قطرات امولسیون و افزایش گرانروی می‌شود. این نتایج با یافته‌های

Heldman و همکاران (۱۹۹۹) که کاهش اندازه قطرات را به دلیل افزایش تراکم در واحد حجم، به علت افزایش گرانروی دانستند، مطابقت دارد. همانطور که در جدول ۴ ملاحظه می‌گردد، افزایش غلظت در تمامی موارد، باعث کاهش تدریجی شاخص رفتار جریان و افزایش ضریب قوام شد. افزایش ضریب قوام در امولسیون، به دلیل افزایش خاصیت گرانروی و کاهش نیروی جاذبه بین قطرات می‌باشد و روند تغییرات آن، نشان‌دهنده رفتار گرانروی ظاهری در مقابل سرعت برش است. همچنین شاخص رفتار جریان، در همه‌ی موارد کمتر از ۱ بود که با افزایش غلظت، کاهش یافت و رفتار روان‌شوندگی در غلظت‌های بالاتر بهتر دیده شد.

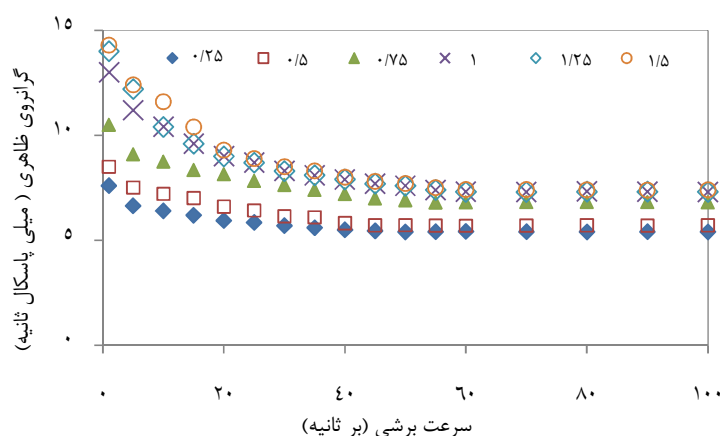
جدول ۴- پارامترهای قانون توان امولسیون‌های حاوی غلظت‌های مختلف مانوپروتئین

| غلظت بیوامولسیفایر (درصد) | K(Pa.S ⁿ) | n | ضریب R ² |
|---------------------------|-----------------------------|----------------------------|---------------------|
| ۰/۲۵ | ۰/۰۵۲۱±۰/۰۰۳۳ ^{d*} | ۰/۹۶۰ ±۰/۰۲۵ ^e | ۰/۹۹۸ |
| ۰/۵ | ۰/۰۶۱۹±۰/۰۰۲۳ ^{dc} | ۰/۹۵ ±۰/۰۲۱ ^d | ۰/۹۹۷ |
| ۰/۷۵ | ۰/۰۸۰۱±۰/۰۰۱۵ ^c | ۰/۹۳۱ ±۰/۰۱۱ ^c | ۰/۹۹۵ |
| ۱ | ۰/۱۱۲۰±۰/۰۰۳۳ ^b | ۰/۹۰۱ ±۰/۰۱۷ ^b | ۰/۹۹۶ |
| ۱/۲۵ | ۰/۱۲۱۸±۰/۰۰۲۷ ^b | ۰/۸۹۶ ±۰/۰۱۵ ^{ab} | ۰/۹۹۳ |
| ۱/۵ | ۰/۱۴۰۱±۰/۰۰۳۵ ^a | ۰/۸۸۰ ±۰/۰۲۰ ^a | ۰/۹۹۷ |

*نتایج در هر ستون با حروف غیرمشابه، دارای اختلاف آماری معنی‌دار (P<۰/۰۵) می‌باشند.

حرکت براونی ذرات، به قدر کافی افزایش یافت، قطرات امولسیون در امتداد جریان، منظم شده و مقاومت کمتری به جریان نشان دادند، از این رو گرانروی در این شرایط کاهش یافت. در سرعت‌های بالاتر، نیروهای هیدرودینامیکی غلبه کرده و قطرات به همان وضعیت در جهت جریان باقی می‌مانند، در نتیجه گرانروی ثابت است (McClement, 2005; Najaf Najafi et al., 2011).

ارتباط بین گرانروی ظاهری و سرعت برش در امولسیون‌های با مقادیر مختلف مانوپروتئین در شکل ۶ آمده است. همانطور که ملاحظه می‌گردد، گرانروی ظاهری تمام نمونه‌ها، با افزایش سرعت برشی، کاهش یافت و به مقدار تقریباً ثابتی رسید که در واقع رفتار روان‌شوندگی با برش را نشان داد. به این ترتیب که با افزایش میزان سرعت برشی، گرانروی امولسیون‌ها کاهش یافت و زمانی که سرعت برشی برای غلبه بر



شکل ۶- اثر سرعت برشی بر گرانروی ظاهری امولسیون‌های حاوی غلظت‌های مختلف مانوپروتئین

قطرات به علت افزایش اندازه قطرات و کاهش سطح به حجم، معمولاً با کاهش گرانروی امولسیون همراه است (Tadros, 2004) و انبوهش قطرات به علت گیرافتادن آب، وجود فضاهای خالی و افزایش کسر حجمی موثر، افزایش گرانروی ظاهری را به همراه دارد (McClement, 2005).

در طی نگهداری، گرانروی و ضریب قوام در نمونه‌های امولسیون تا غلظت ۱ درصد، افزایش یافت و همچنین یک کاهش تدریجی در شاخص رفتار جریان مشاهده گردید. افزایش ضریب قوام و رفتار روان-شوندگی با برش، نشان‌دهنده وقوع پدیده تجمع و انبوهش قطرات بود. وقوع پدیده درهم‌آمیختگی

جدول ۵- پارامترهای قانون توان امولسیون‌های حاوی غلظت‌های مختلف مانوپروتئین پس از چهار هفته نگهداری

| غلظت بیوامولسیفایر (درصد) | K(Pa.S ⁿ) | n | ضریب R ² |
|---------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------|
| ۰/۲۵ | ۰/۳۱۱۰±۰/۰۰۳ ^c | ۰/۸۰۳±۰/۰۲۰ ^c | ۰/۹۹۸ |
| ۰/۵ | ۰/۲۷۹۱±۰/۰۰۲ ^d | ۰/۸۳۵±۰/۰۲۱ ^d | ۰/۹۹۷ |
| ۰/۷۵ | ۰/۲۴۸۳±۰/۰۰۳ ^c | ۰/۸۵۲±۰/۰۱۵ ^c | ۰/۹۹۵ |
| ۱ | ۰/۱۴۸۰±۰/۰۰۱۷ ^b | ۰/۸۸۷±۰/۰۱۶ ^b | ۰/۹۹۶ |
| ۱/۲۵ | ۰/۱۳۷۳±۰/۰۰۳ ^b | ۰/۸۸۹±۰/۰۲۵ ^b | ۰/۹۹۳ |
| ۱/۵ | ۰/۱۵۰۱±۰/۰۰۲۷ ^a | ۰/۸۶۹±۰/۰۱۵ ^a | ۰/۹۹۷ |

^a نتایج در هر ستون با حروف غیرمشابه، دارای اختلاف آماری معنی‌دار ($P < 0.05$) می‌باشند.

درصد مانوپروتئین، خصوصیات و پایداری بالاتری نسبت به سایر غلظت‌ها داشت. مطالعه رفتار و شاخص‌های رئولوژیکی امولسیون نیز مشخص ساخت که در این غلظت، وقوع پدیده انبوهش قطرات به واسطه اثر ترکیبی دافعه الکترواستاتیکی و دافعه فضایی ناشی از شاخه‌های پلیمری مانوز، تا حد زیادی کاهش یافته است. بنابراین بیوامولسیفایر مانوپروتئین، به دلیل ویژگی‌های خوب امولسیون‌کنندگی، فعالیت سطحی مناسب و پایداری بالا در طی نگهداری می‌تواند به عنوان یک امولسیفایر طبیعی موثر، جهت امولسیون‌های غذایی، دارویی و با توجه به گرانروی ظاهری پایین آن جهت استفاده در نوشیدنی‌ها، قابل پیشنهاد باشد. نظر به تنوع ویژگی‌های مواد غذایی، تحمل این بیوامولسیفایر به تنش‌های محیطی، مانند pH، نمک و حرارت نیز بررسی شده که در مقاله دیگری منتشر خواهد شد.

سپاسگزاری

این پژوهش با استفاده از امکانات آزمایشگاهی پژوهشکده علوم و صنایع غذایی مشهد انجام شده که بدینوسیله نویسندگان مراتب قدردانی و تشکر خود را اعلام می‌دارند. همچنین از کارکنان محترم آزمایشگاه بیوفیزیک مواد غذایی این پژوهشکده، بابت همکاری در انجام آزمایش‌ها، صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

علی‌رغم ظهور هر دو پدیده در طی نگهداری، نتایج نشان داد، گسترش انبوهش قطرات بر اساس تصاویر ریزساختار امولسیون (نتایج نشان داده نشده است)، بیشتر از درهم‌آمیختگی قطرات بود، به طوری که در میان غلظت‌های مختلف، گرانروی امولسیون در غلظت ۰/۵ درصد بعد از دوهفته و در غلظت ۰/۷۵ بعد از سه هفته، افزایش یافت که نشان دهنده وجود قطرات به هم پیوسته، در امولسیون بود. درحالی که در غلظت‌های بالاتر، تغییر معنی‌داری در میزان گرانروی ظاهری مشاهده نشد که تاییدی بر نتایج بخش‌های قبلی این تحقیق می‌باشد. این رفتار در مورد امولسیون‌های حاوی صمغ قدومه شیرازی توسط Koocheki و همکاران (۲۰۰۹) و در امولسیفایر دانه کتان توسط Wang و همکاران (۲۰۱۰)، نیز گزارش شده است.

نتیجه‌گیری

با توجه به استقبال روز افزون مصرف امولسیفایرها، تمایل به یافتن منابع جدید جهت تولید امولسیفایرهای طبیعی از اهمیت قابل توجهی برخوردار می‌باشد. در این پژوهش، شاخص‌های کیفی امولسیون روغن در آب حاصل از مانوپروتئین مورد بررسی قرار گرفت و با تعیین خصوصیات و پایداری امولسیون، اطلاعات پایه و اساسی جهت کاربرد این بیوامولسیفایر به دست آمد. امولسیون تهیه شده با غلظت ۱/۲۵

منابع

1. Aktas, N., Boyaci, H., Mutlu, M. & Tanyolac, A. 2008. Optimization of lactose utilization in deproteinated whey by *Kluyveromyces marxianus* using response surface methodology. *Bioresource Technology*, 97: 2252-2259.
2. Amaral, P. F., Silva, J. M., Lehoccky, M. & Coutinho, J. A. 2008. Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochemistry*, 41:1894-1898.
3. Association of Official Analytical Chemists, (AOAC). 2005. Official Methods of Analyses, 14 Ed ; Association of official Analytical Chemists: Washington, DC, USA.
4. Banat, I. M. & Cameotra, S. 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53: 495-508.

5. Cameron, D. R., Cooper, D. G. & Neufeld, R. J. 1990. The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* Is an effective bioemulsifier. Applied and Environmental Microbiology, 54: 1420-1425.
6. Chanamai, R. & Mc Clements, D. J. 2002. Depletion flocculation of beverage emulsions by gum arabic and modified starch. Journal of Food Science, 66: 457-463.
7. Dalgleish, D. G. 2004. Food Emulsions: Their Structure and properties in food Emulsion. Marcel Dekker, New York.
8. Dickinson, E. 2009. Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. Food Hydrocolloids, 23: 1473-1482.
9. Dikit, P., Maneerat, H. & Aran, H. 2010. Emulsifier properties of mannoprotein extract from yeast isolated from sugar palm wine. Science Asia, 36: 312-318.
10. Dubios, M. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry, 28: 350-356.
11. Guo, Q. & Mu, T. H. 2010. Emulsifying properties of sweet potato protein: Effect of protein concentration and oil volume fraction. Food Hydrocolloids, 1: 1-9.
12. Heldman, C., Cabrera, R. I., Momper, B., Kuroпка, R. & Zimmerschied, K. 1999. Influence of nonionic emulsifiers on the properties of vinyl acetate/VeoVa10 and vinyl acetate/ethylene emulsions and paints. Progress in Organic Coatings, 35: 69-77.
13. Huang, X., Kakuda, Y. & Gui, W. 2001. Hydrocolloids in emulsion: Particle size distribution and interfacial activity. Food Hydrocolloids, 15: 533-542.
14. Koocheki, A., Kadkhodae, R., Mortazavi, S. A., Shahidi, F. & Taherian, A. R. 2009. Influence of Alyssum homolocarpum seed gum on the stability and flow properties of O/W emulsion prepared by high intensity ultrasound. Food Hydrocolloids, 23: 2416-2424.
15. Kumyrzaev, A. A. & Schubert, H. 2004. Influence of KCl on the physicochemical properties of whey protein stabilized emulsions. Food Hydrocolloids, 18: 13-19.
16. Liu, X. Y., Wang, Q. X. & Liu, H. Z. 2009. A new isolation methods of mannan and glucans from spent yeast *saccharomyces cereviciea*. Food Hydrocolloids, 22: 239-247.
17. Liu, H. Z., Wang, Q., & He, Y. 2010. Immunoactivities and antieoplastic activities of *Saccharomyces cerevisiae* mannoprotein. Carbohydrate Polymers, 5: 37-43.
18. Lizicarova, I., Matulova, M. & Capek, K. 2007. Human pathogen *candida dubliniensis*: A cell wall mannan with a high content of mannose residues. Carbohydrate Polymers, 10: 1016-1023.
19. Lukondeh, T., Ashboit, N. & Rogers, P. L. 2003. Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* as a source of yeast autolysates. Journal International Microbiology and Biotechnology, 30: 52-56.
20. Melani, M. L. & Morrissey, J. P. 2010. *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow. Fungal Biology Reviews, 24: 17-26.
21. McClement, D. J. 2004. Protein-stabilized emulsions. Current Opinion in Colloid and Interfaces Science, 9: 305-313.
22. McClement, D. J. 2005. Food emulsions, principles, practice and techniques. Boca Raton, Florida: CRC press.

23. Najaf Najafi, M., Kadkhodae, R., Mortazavi, S. A. & Tabatabaee, F. 2011. Influence of Hi-Cap₁₀₀ and Tween₈₀ Interaction on the Properties of Cardamom Oil-in-water Emulsion and its Microcapsules. Iranian Food Science and Technology Research Journal, 4: 254-262.
24. Sciarini, L. S., Malsonado, F., Ribotta, P. D. Perez, G. T., & Leon, A. E. 2008. Chemical compositions and functional properties of Gleditsia tricanthos gum. Food Hydrocolloids, 23: 306-313.
25. Sun, C. & Gunasekaran, S. 2009. Effects of protein concentration and oil phase volume fraction on the stability and rheology of menhaden oil-in-water emulsions stabilized by whey protein isolate with xanthan gum. Food Hydrocolloids, 23:165-174.
26. Surch, J., Ward, L. & McClements, J. 2006. Ability of conventional and nutritionally-modified whey protein concentrates to stabilize oil-in-water emulsions. Food Research International, 39: 761-771.
27. Tadros, T. 2004. Application of rheology for assessment and prediction of the long-term physical stability of emulsions. Advances in Colloid and Interface Science, 108-109: 227-258.
28. Tokle, T., Dekker, E. A. & McClements, D. J. 2012. Utilization of interfacial engineering to produce novel emulsion properties: pre-mixed lactoferrin protein emulsifiers. Food Research International, 49: 46-52.
29. Wang, B., Li, D., Wang, L. W. & Shi, J. 2010. Ability of flaxseed and soybean protein concentrates to stabilize oil-in-water emulsions. Food Engineering, 100: 417-426.
30. Wang, B., Li, D. & Ozkan, N. 2010. Effect of concentrates flaxseed protein on the stability and rheological properties of soybean oil-in-water emulsions. Journal of Food Engineering, 96: 555-561.
31. Zhao, X., Miao, H., & Guan, H. S. 2000. Determination of molecular weight and molecular weight distribution of sulfated polysaccharide by GPC. Journal of ocean University of Qing Dao, 30: 623-626.

A study on the effect of mannoprotein extracted from *Kluyveromyces marxianus* on the quality attributes and stability of oil-in-water emulsion

Jalal Mohammadzadeh^{1*}, Farideh Tabatabaee², Ali Mortazavi³,
Rassoul Kadkhodae⁴, Arash Koocheki⁵

1. Ph.D Student, Department of Food Science & Technology, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
- *Corresponding Author (jmohammadzadeh@yahoo.com)
2. Associate Professor, Department of Food Science & Technology, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
3. Professor, Department of Food Science & Technology, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
4. Associate Professor, Department of Food Nanotechnology, Research Institute of Food Science & Technology, Mashhad
5. Associate Professor, Department of Food Science & Technology, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad

Abstract

Mannoprotein is a glycoprotein consistency of a poly mannose backbone covalently attached to a protein moiety. It was extracted and purified from the cell wall of *Kluyveromyces marxianus* yeast. After having determined a number of its properties, the influence of mannoprotein (0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25 and 1.5 % W/V) on the formation and stability of ultrasonically prepared emulsion (ratio 20:80 % W/W) was studied and changes in the quality attributes of samples during 1, 7, 14, 21 and 28 days were monitored. The results indicated that surface and interfacial tensions decreased significantly by increasing mannoprotein from 0.25 to 1.25%. The Surface electrical charge of droplets, however, increased with concentration. The drop size distribution curves were found to be monomodal for all samples and appeared noticeably sharp at 1.25%. Storage of emulsions samples for a period of four weeks led to a significant increase in the size of droplets particularly in the samples containing 0.25 until 1% mannoprotein, while negligible changes were observed of higher concentration. The results rheological flow properties were showed increasing mannoprotein concentration leading to decreased flow behavior index and increased the apparent viscosity and consistency index of all samples. In addition, the flow behavior of emulsion samples were had to be non-newtonian and shear-thinning.

Keywords: Emulsion properties, Flow behavior, *Kluyveromyces marxianus* yeast, Mannoprotein