



## تولید کانجوگه ایزوله پروتئین سویا-کربوکسی متیل سلولز از طریق پلاسمای غیرحرارتی

هدیه شرف الدین<sup>۱</sup>، نفیسه سلطانی زاده<sup>۲\*</sup>

۱- کارشناس ارشد، 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.

### اطلاعات مقاله

### چکیده

#### تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۲۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۱۰

#### کلمات کلیدی:

پلاسمای سد دی الکتریک،

پروتئین سویا،

کانجوگه،

کربوکسی متیل سلولز.

DOI: 10.22034/FSCT.19.126.257

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.126.8.9

\* مسئول مکاتبات:

soltanizadeh@iut.ac.ir

هدف از مطالعه ی حاضر بررسی امکان تشکیل کمپلکس ایزوله پروتئین سویا-کربوکسی متیل سلولز توسط پلاسمای غیرحرارتی بود. در این زمینه، مخلوط ۱:۱ ایزوله پروتئین سویا و کربوکسی متیل سلولز تحت تیمار پلاسمابه مدت ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه با ولتاژهای ۱۶، ۱۸ و ۲۰ کیلوولت قرار گرفت و میزان حلالیت، فعالیت و پایداری امولسیون، میانگین اندازه ذرات امولسیون، میزان آمین آزاد، طیف مادون قرمز تبدیل فوریه و الگوی الکتروفورز کمپلکس های حاصل بررسی شدند. نتایج حاصل از الکتروفورز، طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه و درجه پیوندی بیانگر تشکیل کانجوگه ایزوله پروتئین سویا-کربوکسی متیل سلولز پس از اعمال تیمار پلاسمای بود که تحت تاثیر ولتاژ و زمان اعمال پلاسمای مقادیر متفاوتی از آن شکل گرفت. کانجوگه های حاصل، حلالیت و فعالیت امولسیون کنندگی قابل توجهی نسبت به مخلوط حاصل از این دو ترکیب داشتند ( $p < 0.05$ ). کوچکترین اندازه ذرات امولسیون در تیمار ۱۸ کیلوولت به مدت ۵ دقیقه مشاهده گردید که طی زمان نیز از پایداری خوبی نسبت به نمونه مخلوط برخوردار است. به طور کلی می توان بیان نمود فرایند پلاسمای غیرحرارتی قادر است در زمانی بسیار کوتاه، کمپلکس پروتئین- پلی ساکارید با قابلیت امولسیون کنندگی مطلوب، تشکیل دهد.

## ۱- مقدمه

تشکیل دهند. پلاسمایی که به وسیله ی میدان‌های الکترومغناطیسی تولید می‌شود معمولاً به عنوان تخلیه الکتریکی شناخته می‌شود. سپس حامل‌های بار در میدان الکتریکی شتاب گرفته و انرژی خود را در اثر برخورد با سایر ذرات به پلاسمای انتقال می‌دهند. الکترون‌ها در طول میدان الکتریکی جهت گیری کرده و با ذرات گاز خنثی برخورد می‌کنند و ایجاد یون‌ها و الکترون‌های بیشتری می‌نمایند. یون‌های مثبت به سمت کاتد جذب می‌شوند و بر اثر برخورد با سایر ذرات، الکترون‌های ثانویه به وجود می‌آیند. در این حال یونیزاسیون پی در پی بهمینی از ذرات باردار را به وجود می‌آورد. راه‌های مختلفی از جمله حرارت، فشار، واکنش‌های شیمیایی و میدان الکتریکی، میدان الکترومغناطیسی، مایکروویو و فرکانس رادیویی، نور، رادیو اکتیو یا اشعه ی ایکس برای اعمال انرژی مورد نیاز به یک گاز خنثی یا سیال دی الکتریک وجود دارد [۶].

اخیراً مطالعات گسترده ای برای اصلاح ساختار پروتئین و خواص عملکردی توسط پلاسمای سرد انجام شده است. این موارد شامل نمونه‌هایی است که بر بهبود ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پروتئین آب پنیر [۷]، تغییر در ساختار دوم پروتئین زئین [۸]، افزایش قابل توجه فعالیت  $\alpha$  آمیلاز در برنج قهوه ای [۹] و بهبود قابلیت حلالیت و فعالیت امولسیون پروتئین بادام زمینی [۱۰] متمرکز شده است.

روش پلاسمای غیر حرارتی علاوه بر توانایی خود در حفظ کیفیت مواد غذایی از مزایای دیگری از قبیل کاهش عوامل بیماریزا، هزینه مناسب، زمان فرآیند کوتاه، عدم نیاز به آب تحت شرایط اتمسفری، سازگاری و پایداری برخوردار است. همچنین این روش دوست دار محیط زیست نیز می‌باشد [۱۱]. از اینرو هدف از تحقیق حاضر، تولید کمپلکس پروتئین-پلی ساکارید از پروتئین سویا با استفاده از روش پلاسمای غیرحرارتی است تا بتوان این فرایند را در مدت زمان بسیار کوتاهی انجام داد. همچنین اثر این فرایند بر ویژگی‌های کمپلکس تولید شده بررسی خواهد شد.

## ۲- مواد و روش‌ها

به منظور آماده‌سازی مخلوط SPI و CMC، ابتدا محلول ۵ درصد وزنی وزنی هریک به طور جداگانه آماده و به نسبت ۱:۱ با

کانجوگه پروتئین-پلی ساکارید بیش از یک قرن است که به دلیل فعالیت سطحی پروتئین و آب دوستی پلی ساکارید، به موضوعی جذاب برای تحقیقات تبدیل شده است. در واقع مولکول بزرگی که از برهمکنش پروتئین و پلی ساکارید بدست می‌آید دارای هر دو ویژگی دو پلیمر زیستی است [۱]. کانجوگه‌ها که به واسطه ی تشکیل پیوندهای کووالانسی بین پروتئین و پلی ساکاریدها ایجاد می‌شوند، منجر به ایجاد پیوندهای دائمی غیر الکترواستاتیک بین دو بیوپلیمر می‌شوند. مهم ترین مزیت پیوند کووالانسی بین پروتئین و پلی ساکارید در مقایسه با پیوندهای غیر کووالانسی، حفظ پروتئین‌ها است [۲]. علاوه بر این، کانجوگه پروتئین و پلی ساکارید باعث بهبود خواص عملکردی پروتئین‌ها از جمله ظرفیت و پایداری امولسیون، حلالیت پروتئین، ظرفیت کف کنندگی، پایداری کف و ثبات حرارتی پروتئین می‌شود [۱]. دو روش عمده برای تشکیل پیوند میان پروتئین و پلی ساکارید در صنایع غذایی وجود دارد. اولین روش استفاده از آنزیم ترانس گلوتامیناز است که پروتئین اصلی را به پروتئین دیگری که در ساختار پلی ساکارید وجود دارد، متصل می‌کند [۳]. به طور کلی می‌توان گفت در روش تولید کانجوگه با استفاده از آنزیم، تنها از پلی ساکاریدهایی می‌توان استفاده کرد که حاوی پروتئین و یا آمین نوع اول باشند. همچنین محدودیت دسترسی و هزینه‌ها، استفاده از این روش را در مقیاس صنعتی با محدودیت جدی مواجه می‌کند [۴]. روش دوم استفاده از واکنش میلارد است. در این روش گروه‌های آمین آزاد پروتئین به گروه احیا کننده پلی ساکارید متصل می‌شوند. واکنش میلارد از نظر زمان و درجه حرارت برای تولید کانجوگه‌های پروتئین-پلی ساکارید دارای محدودیت است. همچنین با در نظر گرفتن احتمال تشکیل محصولات جانبی سمی، کاهش ارزش تغذیه ای و مشکلات مربوط به تغییر رنگ و عطر، یافتن روشی نوین با محدودیت‌های کمتر بسیار ضرورت می‌یابد [۵].

یکی از فرآیندهای نوینی که می‌توان در زمینه تولید کانجوگه پروتئین-پلی ساکارید مورد استفاده قرار داد، پلاسمای غیرحرارتی است. زمانی که به گازهای خنثی نیرو وارد شود، اجزای تشکیل دهنده ی گاز می‌توانند به اجزای باردار تبدیل شده و پلاسمای را

که در آن  $A_0$  جذب مخلوط SPI و CMC و At جذب کانجوگه SPI و CMC می‌باشد.

برای اندازه‌گیری طیف مادون قرمز از پودرهای مخلوط SPI و CMC تیمار شده با پلاسما سرد استفاده شد و سپس در دستگاه ATR (تسنور ۲۷<sup>۲</sup>، آلمان) در دامنه‌ی طول موج  $cm^{-1}$  ۴۰۰۰-۶۰۰۰ مورد آزمون قرار گرفت [۱۵].

الگوی الکتروفورز کانجوگه SPI و CMC طبق روش لاملی (۱۹۷۰) انجام شد [۱۶] و در نهایت، تجزیه واریانس بر اساس طرح کاملاً تصادفی و با استفاده از آزمون فاکتوریل در سطح اطمینان ۹۵٪ انجام شد.

### ۳- نتایج و بحث

#### ۳-۱- حلالیت

حلالیت مخلوط SPI و CMC، پس از اعمال تیمار توسط پلاسما و تشکیل کانجوگه به طور چشم‌گیری افزایش یافت (شکل ۱). حلالیت با مدت زمان و ولتاژ اعمال شده رابطه‌ی مستقیم داشته و با افزایش یافتن هریک از این عوامل، حلالیت کانجوگه‌ها نیز افزایش یافت. تشکیل کانجوگه SPI و CMC علاوه بر اثر ناشی از حضور پلی ساکارید، از طریق ایجاد تعادل میان گروه‌های آبگریز و آبدوست باعث افزایش حلالیت و بهبود ویژگی‌های عملکردی پروتئین‌ها می‌شود. در اثر اتصال پلی ساکارید آبدوست به سطح پروتئین یا پپتید، به دلیل قابلیت تشکیل پیوند هیدروژنی گروه‌های هیدروکسیل موجود در ساختار پلی ساکارید، سطح آبگریزی پروتئین‌ها تغییر کرده و جاذبه بین پروتئین‌ها و مولکول‌های آب بهبود می‌یابد [۱۷].

نتایج به دست آمده از بررسی میزان حلالیت با نتایج حاصل از درجه پیوند کانجوگه SPI و CMC همبستگی مثبتی داشت (شکل ۳).

بررسی‌ها نشان داده است که شکل‌گیری رادیکال‌های آزاد طی تیمار با پلاسما منجر به تشکیل پراکسیدها و هیدروپراکسیدها می‌شود. این ترکیبات، آغازگر واکنش‌های پلیمریزاسیون هستند و موجب ایجاد اتصال عرضی بین بیوپلیمرها می‌شوند. از سوی

یکدیگر مخلوط شدند. پس از انجماد نمونه‌ها در فریزر ۱۸- درجه سلسیوس، در خشک‌کن تصعیدی (دنا وکیوم، ایران) خشک شدند. میزان ۲ گرم از مخلوط SPI و CMC در پتری دیش ریخته شد و سپس الکتروود بالایی در فاصله ۱ سانتیمتری از الکتروود پائینی قرار گرفت. سپس نمونه‌ها به مدت ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه در معرض پلاسما سرد فشار اتمسفری از نوع تخلیه سد دی الکتریک (کاوش یاران فن پویا، ایران) با ولتاژ ۱۶، ۱۸ و ۲۰ کیلوولت قرار گرفتند. سپس خصوصیات فیزیکوشیمیایی کانجوگه‌ها ارزیابی شد.

ابتدا محلول ۳ درصدی از مخلوط SPI و CMC و کانجوگه تیمار شده توسط پلاسما تهیه گردید و پس از سانتریفیوژ (هرمل<sup>۱</sup>، آلمان) با دور ۴۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه، میزان پروتئین سوپرناتانت به روش بیوره اندازه‌گیری شد. درصد حلالیت پروتئین از طریق فرمول زیر محاسبه گردید [۱۲].

$$100 \times \frac{\text{پروتئین موجود در سوپرناتانت}}{\text{درصد حلالیت}} = \text{میزان پروتئین اولیه}$$

(معادله ۱)

برای اندازه‌گیری فعالیت امولسیون‌کنندگی کانجوگه از روش کدورت سنجی پیرس و کینسلا (۱۹۷۸) استفاده شد [۱۳]. پایداری امولسیون، نمونه‌ها پس از ۲ ساعت نگهداری امولسیون‌ها در دمای محیط، مطابق با روش فعالیت امولسیون‌کنندگی به دست آمد. میزان پایداری از طریق معادله ۲ محاسبه شد.

(معادله ۲)

$$ESI = [A_0 / (A_0 - A)] \times 10$$

برای اندازه‌گیری اندازه قطرات امولسیون، ۴۵ میلی لیتر از محلول پروتئینی ۰/۵٪ با ۵ میلی لیتر روغن به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۸۰۰۰ rpm هموژن شدند. سپس میانگین ذرات امولسیون در روز اول و روز هفتم نگهداری در دمای ۴ درجه سانتیگراد توسط دستگاه مسترسایزر ۲۰۰۰ (شرکت مالورن<sup>۲</sup>، انگلستان) اندازه‌گیری شد [۱۴].

درجه‌ی پلیمریزاسیون به روش آرتوفتال دی آلدئید و از طریق فرمول زیر محاسبه گردید [۲].

(معادله ۳)

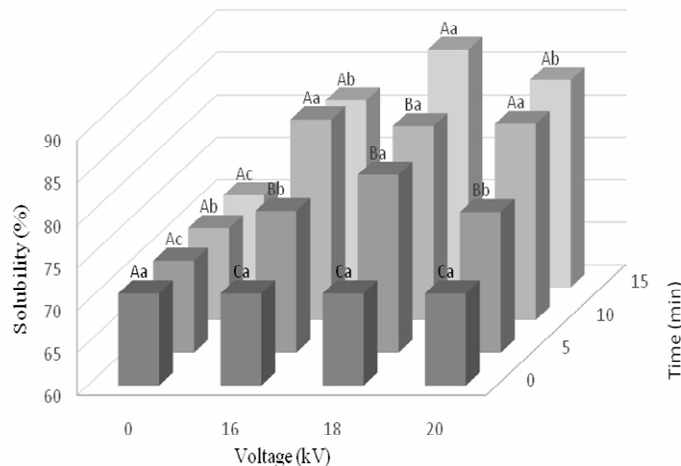
$$DG(\%) = [(A_0 - At) / A_0] \times 100$$

1. Hermel
2. Malvern

3. Tensor

مخلوط پروتئین-پلی ساکارید بیشتر است اما کمتر از ولتاژ ۱۸ کیلوولت و زمان ۱۵ دقیقه می‌باشد. در تحقیقاتی که توسط ژو و همکاران (۲۰۱۳) و ما و همکاران (۲۰۲۰) انجام شد و تاثیر شکل گیری کانجوگه‌ها بر حلالیت SPI مورد بررسی قرار گرفت نیز مشخص گردید حلالیت SPI پس از تشکیل کمپلکس با پلی ساکاریدها به طور چشم گیری افزایش می‌یابد [۲،۱۹].

دیگر، طی تیمار با پلاسما واکنش‌های تخریبی نیز اتفاق می‌افتد که مهم ترین آن‌ها تکه تکه شدن بیوپلیمرها است. از دیگر واکنش‌هایی که می‌توان طی تیمار با پلاسما با آن اشاره کرد، افزایش آبگریزی سطوح است [۱۸]. به نظر می‌رسد ولتاژ ۱۸ کیلوولت به مدت ۱۵ دقیقه موجب ایجاد اتصال عرضی بین پروتئین و پلی ساکارید شده در حالی که در ولتاژهای کمتر و زمان‌های کمتر اتصال مناسبی بین پروتئین و پلی ساکارید برقرار نشده و در ولتاژها و زمان‌های بیشتر، واکنش‌ها به سمت تخریب پیش رفته و در هر دو حالت با وجود اینکه حلالیت نسبت به

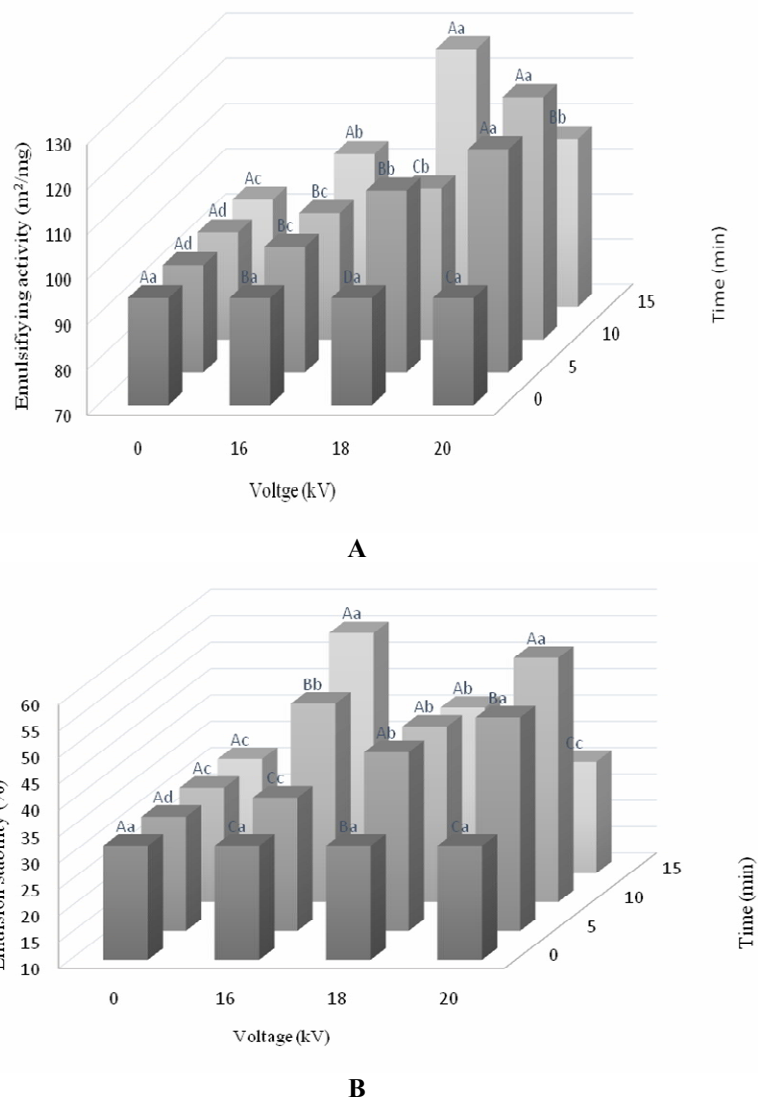


**Fig 1** Solubility of SPI-CMC conjugates as a function of voltage and exposure time to DBD plasma Different uppercase letters indicate a significant difference between plasma exposure times and different lowercase letters indicate a significant difference between different voltages ( $p < 0.05$ ).

پروتئین‌ها و پلی ساکاریدها هر دو در پایدارسازی امولسیون‌های روغن در آب نقش مهمی ایفا می‌کنند. در تشکیل امولسیون، پروتئین‌ها به علت داشتن گروه‌های آبگریز موجود در ساختار خود یک لایه چسبنده و ویسکوالاستیک در اطراف قطرات روغن تشکیل می‌دهند. در صورتی که پلی ساکاریدها فعالیت سطحی کمتری نسبت به پروتئین‌ها دارند و با توجه به خاصیت آبدوستی زیاد، به سمت محیط آبی قرار می‌گیرند و با ایجاد دافعه ی فضایی از نزدیک شدن قطرات و الحاق آنها جلوگیری می‌کنند [۲۰]. با افزایش ولتاژ و زمان اعمال پلاسما، رادیکال‌های آزاد بیشتری شکل گرفته و موجب پلیمریزاسیون پروتئین-پلی ساکارید می‌شود و در زمان‌ها و ولتاژهای زیاد (۲۰ کیلوولت، ۱۵ دقیقه)، تخریب پلی ساکاریدها دیده می‌شود که می‌تواند فعالیت امولسیون کنندگی را کاهش دهد.

### ۳-۳- فعالیت و پایداری امولسیون

بر اساس ارزیابی‌های انجام شده، فعالیت امولسیون کنندگی مخلوط SPI و CMC پس از اعمال تیمار پلاسما، به طور قابل توجهی افزایش یافت (شکل ۲A). با افزایش ولتاژ اعمال شده توسط پلاسما و زمان تیمار، فعالیت امولسیون کنندگی کانجوگه‌ها روند افزایشی داشت. اما با شدت یافتن شرایط تیمار در ولتاژ ۲۰ کیلوولت و مدت زمان ۱۵ دقیقه، فعالیت امولسیون کنندگی با روند کاهشی مواجه شد. با توجه به نتایج حاصل از درجه پلیمریزاسیون (شکل ۳)، شکل گیری کانجوگه SPI و CMC طی تیمار با پلاسما تایید گردید. از آنجایی که افزایش فعالیت امولسیون کنندگی SPI توسط ایجاد کمپلکس با CMC به اثبات رسیده است [۱۴]، بنابراین می‌توان روند افزایشی در فعالیت امولسیون کنندگی را از این طریق نیز توجیه نمود.



**Fig 2** Effect of voltage and exposure time of DBD plasma on emulsifying capacity (A) and emulsion stability (B) of SPI-CMC conjugates. Different uppercase letters indicate a significant difference between plasma exposure times and different lowercase letters indicate a significant difference between different voltages ( $p < 0.05$ ).

ساکارید می‌تواند در سطح مشترک آب و روغن جذب شده و موجب شکل‌گیری فیلم پروتئین و پلی ساکارید شود که مسئول پایداری امولسیون‌های می‌باشد [۲]. در اینجا نیز با افزایش زمان اعمال پلاسما، پایداری امولسیون افزایش می‌یابد. اما کمترین پایداری در ولتاژ ۱۸ کیلوولت دیده می‌شود که برخلاف نتایج فعالیت امولسیون‌کنندگی است. به نظر می‌رسد این کاهش پایداری در ولتاژ ۱۸ کیلوولت مربوط به کاهش پایداری امولسیون SPI باشد (نتایج نشان داده نشده است).

بر اساس شکل B، با افزایش ولتاژ اعمال شده و زمان تیمار، پایداری امولسیون به طور چشم‌گیری افزایش یافت. بر اساس مطالعات، دناتوراسیون جزئی و بی‌نظمی در ساختار پروتئین، پتانسیل جذب در سطح مشترک آب و روغن را افزایش می‌دهد [۲۱]. بنابراین تیمار با پلاسما از طریق تأثیر بر پروتئین می‌تواند منجر به بهبود خواص امولسیفایری کانجوگه حاصل از SPI و CMC گردد. علاوه بر این، افزایش ویسکوزیته فاز پیوسته امولسیون توسط پلی ساکارید موجود در کانجوگه می‌تواند موجب بهبود پایداری امولسیون گردد. کانجوگه پروتئین-پلی

### ۳-۳- میانگین اندازه ذرات امولسیون

مطابق با نتایج به دست آمده، امولسیون‌های تولید شده توسط SPI، اندازه ذرات ۳ میکرون داشتند که پس از نگهداری به مدت دو هفته، به قطر ۸/۱ میکرون می‌رسند. همچنین مخلوط SPI و CMC قادر بود امولسیون با ذرات ۳/۵ تشکیل دهد که پایداری تقریباً مشابهی با امولسیون ناشی از ذرات SPI داشت. کانجوگه‌های حاصل از تیمار با پلاسما سرد، امولسیون‌هایی با اندازه ذرات ۳/۵-۵/۸ میکرون ایجاد کردند. تشکیل پیوند میان SPI و CMC و در نتیجه تولید ماکرومولکول‌هایی با اندازه بزرگتر از SPI می‌تواند در افزایش اندازه قطرات نسبت به SPI مؤثر باشد.

با توجه به جدول ۱ از نظر میزان افزایش اندازه قطرات مشخص شد کانجوگه‌هایی که در شرایط تیمار پلاسما سرد با ولتاژ ۱۶

و ۱۸ کیلوولت و مدت زمان ۵ دقیقه ایجاد شدند، پایداری بهتری داشتند. در حقیقت اتصال CMC به پروتئین موجب شد که SPI به لحاظ تعادل آبدوست-آبگریز بهبود یافته و در نتیجه ویژگی‌های امولسیون‌کنندگی بهتری ایجاد کند که احتمالاً به دلیل تجمع برگشت ناپذیر مولکول‌های پروتئین باز شده و جلوگیری از برهمکنش پروتئین-پروتئین به دلیل پلی ساکارید اتصالی است [۲۲]. در این شرایط، مولکول‌های CMC-SPI کانجوگه شده اجازه نمی‌دهند قطرات روغن امولسیون شده در واکنش‌های فرعی ناشی از برهمکنش‌های واندروالسی و الکترواستاتیک موجود در سیستم امولسیون شرکت کنند [۲۳]. به نظر می‌رسد دافعه ی فضایی و هیدراتاسیون گسترده لایه بین سطحی که برای افزایش پایداری امولسیون حیاتی می‌باشند، با استفاده از CMC تامین می‌گردند [۲۲].

**Table 1** Average size of emulsion droplets (D 3,2) prepared with 10% v/v oil and 4.5% w/v SPI-CMC conjugate (ratio 1:1) and SPI before and after 14 days storage at 4°C.

Voltage (kV)	Time (min)	Mean droplet size 1 <sup>st</sup> day (μm)	Mean droplet size 14 <sup>th</sup> day (μm)	Droplet size increase (%)
0	0	3.51	8.41	1.39
16	5	5.74	8.38	0.45
16	10	3.53	12.37	2.50
16	15	5.83	11.97	1.05
18	5	4.25	8.30	0.95
18	10	4.14	12.75	2.09
18	15	4.83	11.48	1.37
20	5	4.32	11.20	1.59
20	10	4.62	10.75	1.32
20	15	5.81	13.88	1.38
SPI		3.32	8.14	1.45

نمونه‌ها پس از تیمار در محیط مایع، جهت گیری گروه‌های قطبی موجود در سطح را تغییر می‌دهد [۱۸].

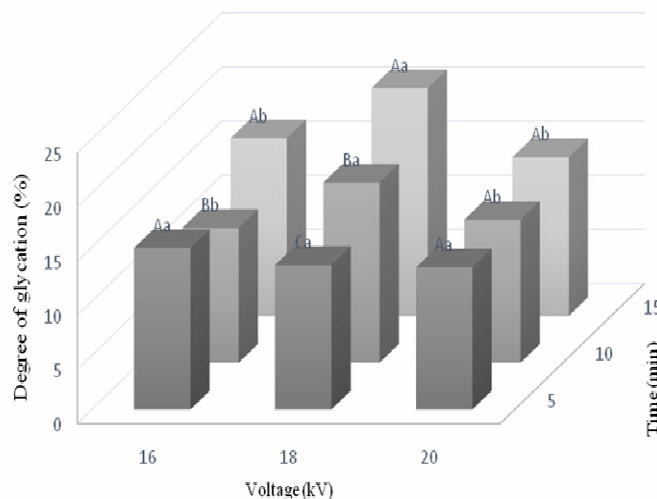
### ۳-۴- درجه پیوندی

اساس تشکیل کمپلکس پروتئین و پلی ساکارید، برهمکنش میان گروه‌های آمین آزاد پروتئین‌ها و گروه‌های احیا موجود در ساختار پلی ساکاریدها است [۲]. همانگونه که در شکل ۳ نیز مشاهده می‌شود، پیشرفت واکنش با زمان اعمال تیمار توسط پلاسما سرد رابطه ای مستقیم دارد. بیشترین درجه پلیمریزاسیون به دست آمده ۲۱ درصد بود که با اعمال ولتاژ ۱۸ کیلوولت به مدت زمان ۱۵ دقیقه به دست آمد. در حالی که برای

برخلاف سایر آنالیزهای انجام شده، در بررسی پایداری امولسیون‌ها بعد از نگهداری به مدت ۲ هفته، روند منظمی در نمونه‌ها مشاهده نگردید. به نظر می‌رسد جهت گیری مجدد گروه‌های قطبی در زمان نگهداری نمونه‌ها پس از تیمار با پلاسما در این زمینه مؤثر باشد. همانگونه که اشاره شد علاوه بر حلالیت، پارامترهای دیگری از جمله شکل فضایی پروتئین، نیروی دافعه، ویژگی‌های سطحی و حضور ترکیبات غیرپروتئینی از عوامل مهم و تاثیر گذار بر امولسیون‌های می‌باشند. گزارش شده است که مدت زمان نگهداری نمونه‌ها پس از اعمال تیمار پلاسما سرد از اهمیت بالایی برخوردار است و هنگام نگهداری

دقیقه اعمال پلاسما، بیشترین درجه پلیمریزاسیون در ولتاژ ۱۸ کیلوولت دیده شد. استفاده از ولتاژهای ۱۶ و ۲۰ کیلوولت نتوانست درجه پلیمریزاسیون بالایی ایجاد کند.

دستیابی به این میزان از درجه پیوند در روش سنتی تشکیل کانجوگه به حداقل ۸ ساعت زمان و دمای ۶۰ درجه نیاز است [۲۱]. از سوی دیگر اگرچه در مدت زمان ۵ دقیقه، تغییر ولتاژ تاثیری بر درجه پیوند نداشت، اما در زمان‌های ۱۰ و ۱۵



**Fig 3** Effect of voltage and exposure time of DBD plasma on the glycation degree of SPI-CMC conjugates. Different uppercase letters indicate a significant difference between plasma exposure times and different lowercase letters indicate a significant difference between different voltages ( $p < 0.05$ ).

هنگامی که CMC به پروتئین متصل می‌شود با گروه‌های بنیادین موجود روی پروتئین مانند  $\text{NH}_2$ - و  $\text{NH}$ - آزاد وارد واکنش می‌شود. حضور توام پیک‌های مشاهده شده در طیف‌های مادون قرمز SPI و CMC در مخلوط این دو ترکیب امری بدیهی بوده اما با این حال در محل و شدت آن‌ها تغییراتی مشاهده گردید. پیک‌های ناحیه آمید ۱ و ۲ و ۳ در کانجوگه ی SPI و CMC به ترتیب در طول موج‌های  $1635 \text{ cm}^{-1}$ ،  $1531 \text{ cm}^{-1}$  و  $1240 \text{ cm}^{-1}$  رویت شدند (جدول ۲). جابجایی در محل پیک‌های متناسب به گروه‌های آمینی را می‌توان ناشی از تاثیر واکنش بر ساختار دوم پروتئین و پلیمریزاسیون در نظر گرفت. وقتی پیوند بین مولکولی و درون مولکولی شکسته می‌شود جذب به طول موج بالاتری جابجا می‌شود [۵]. همانگونه که مشاهده می‌شود پیک مربوط به ناحیه آمید ۲ و ۳ به طول موج بالاتری منتقل شده است. همچنین در تیمار با پلاسما به مدت ۵ دقیقه، افزایش در شدت این پیک‌ها نیز مشاهده می‌شود، بنابراین می‌توان گفت در ابتدا، پیوندهای بین مولکولی پروتئین طی تیمار با پلاسما شکسته شده‌اند و با روی سطح قرار گرفتن گروه‌های

### ۳-۵- طیف سنجی مادون قرمز

شاخص‌ترین پیک‌های جذبی SPI در  $1636 \text{ cm}^{-1}$ ،  $1517 \text{ cm}^{-1}$  و  $1233 \text{ cm}^{-1}$  رویت می‌شوند که به ترتیب متعلق به مناطق آمید ۱، ۲ و ۳ می‌باشند. پیک مشاهده شده در  $1056 \text{ cm}^{-1}$  نیز بیانگر ارتعاشات خمشی C-H خارج از صفحه می‌باشد که می‌تواند حضور ترکیبات آروماتیک را نشان دهد. پیک عریض مشاهده شده در  $3500-3000 \text{ cm}^{-1}$  نیز اساساً ناشی از گروه‌های OH آزاد و ارتعاشات کششی N-H آمین پروتئین سویا می‌باشد [۲۴].

شاخص‌ترین پیک‌های CMC در طول موج  $1014 \text{ cm}^{-1}$  و  $1147 \text{ cm}^{-1}$  مشاهده شد که این ناحیه ( $900-1200 \text{ cm}^{-1}$ ) به اثر انگشت کربوهیدرات شهرت داشته و پیک‌های آن به عنوان پیک‌های ساکاریدی شناخته می‌شوند. پیک‌های این ناحیه از ارتعاشات کششی C-C و ارتعاشات خمشی C-H ناشی می‌شوند. پیک‌های موثر در بررسی ویژگی CMC شامل  $2922 \text{ cm}^{-1}$ ،  $3306 \text{ cm}^{-1}$  و  $3477 \text{ cm}^{-1}$  می‌باشند که به ترتیب از ارتعاشات کششی CH، COO- و OH- ناشی می‌شوند [۲۵].

عاملی NH- افزایش شدت پیک مربوطه مشاهده می‌گردد اما با شدت یافتن شرایط تیمار با پلاسما و درگیر شدن گروه‌های مذکور در واکنش اتصالات عرضی، کاهش پیک‌های متناسب به نواحی آمیدی دیده شد.

**Table 2** Wavenumber and intensity of the SPI and SPI-CMC conjugate FTIR spectrum.

Amide A	-CH3 Asymmetric vibration	Amide I	Amide II	Amide III	Time (min)	Voltage (kV)
3282	2928	-	1633	1535	1232	Wavenumber
0.0252	0.021	-	0.065	0.065	0.042	Absorbance
3294	2920	-	1629	1535	1240	Wavenumber
0.020	0.0240	-	0.030	0.034	0.028	Absorbance
3294	2923	-	1631	1529	1240	Wavenumber
0.025	0.0280	-	0.042	0.037	0.029	Absorbance
3294	2920	-	1633	1533	1240	Wavenumber
0.018	0.0230	-	0.032	0.029	0.025	Absorbance
3294	2923	1644	1631	1537	1240	Wavenumber
0.018	0.0246	0.010	0.031	0.027	0.022	Absorbance
3294	2922	-	1633	1541	1240	Wavenumber
0.031	0.0351	-	0.055	0.048	0.037	Absorbance
3294	2922	-	1631	1539	1240	Wavenumber
0.020	0.0255	-	0.032	0.029	0.023	Absorbance
3294	2922	1644	1633	1539	1240	Wavenumber
0.020	0.0251	0.034	0.033	0.030	0.024	Absorbance
3294	2920	-	1633	1537	1240	Wavenumber
0.020	0.0245	-	0.038	0.034	0.027	Absorbance
3294	2920	-	1635	1537	1240	Wavenumber
0.022	0.0249	-	0.042	0.036	0.029	Absorbance
3294	2923	1644	1633	1533	1240	Wavenumber
0.016	0.0216	0.024	0.025	0.022	0.018	Absorbance

CH<sub>2</sub> می‌باشد [۲۷]. در ولتاژ ۱۶ و ۱۸ کیلوولت، شدت این پیک با اعمال پلاسما به مدت ۵ دقیقه افزایش یافته و سپس با افزایش زمان، از شدت آن کاسته شد. به نظر می‌رسد اعمال پلاسما در زمان کوتاه می‌تواند ساختارهای پروتئینی را باز کرده و موجب افزایش گروه‌های اسیدآمینه آلیفاتیک شود. هرچند با افزایش زمان اعمال پلاسما از شدت آن کاسته شد. یکی از دلایل کاهش شدت این پیک می‌تواند به درگیر شدن این اسیدهای آمینه در واکنش مربوط باشد. همانگونه که می‌توان در جدول ۲ مشاهده نمود، استفاده از ولتاژ ۲۰ کیلوولت نتوانسته است تاثیر قابل توجهی بر شدت این پیک بگذارد. با توجه به ولتاژ بالای استفاده شده، این احتمال وجود دارد که سرعت باز شدن ساختار و شکل‌گیری پیوند افزایش یافته به گونه‌ای که حتی در زمان ۱۵ دقیقه، شکل‌گیری پیوند بر باز شدن ساختار برتری یافته و از این رو کاهش شدت این پیک دیده می‌شود.

گزارش شده است ایجاد پیک جدید در ناحیه  $1647 \text{ cm}^{-1}$  در مخلوط SPI و پلی ساکاریدها بیانگر ارتعاشات کششی C=N بوده و به اثرات واکنش مایلارد مرتبط است [۲۶]. همانگونه که در جدول ۲ مشاهده می‌شود این پیک در تیمارهای ۱۵ دقیقه به وضوح قابل رویت است که با نتایج حاصل از درجه پلیمریزاسیون نیز مطابقت دارد (شکل ۳) زیرا طبق نتایج به دست آمده، در تیمارهای ۱۵ دقیقه، بالاترین میزان درجه پلیمریزاسیون به دست می‌آید. افزایش ولتاژ تا ۱۸ کیلوولت موجب شدت گرفتن این پیک شده که نشان دهنده پلیمریزاسیون بیشتر است. ایجاد اتصالات عرضی منجر به تغییر مکان پیک از  $2928 \text{ cm}^{-1}$  به  $2922 \text{ cm}^{-1}$  و همچنین افزایش پیک مذکور گردید که نشان دهنده نمایان شدن آمینواسیدهای آلیفاتیک در سطح و تغییر در برهمکنش‌های هیدروفوبی در منطقه کشش نامتقارن -

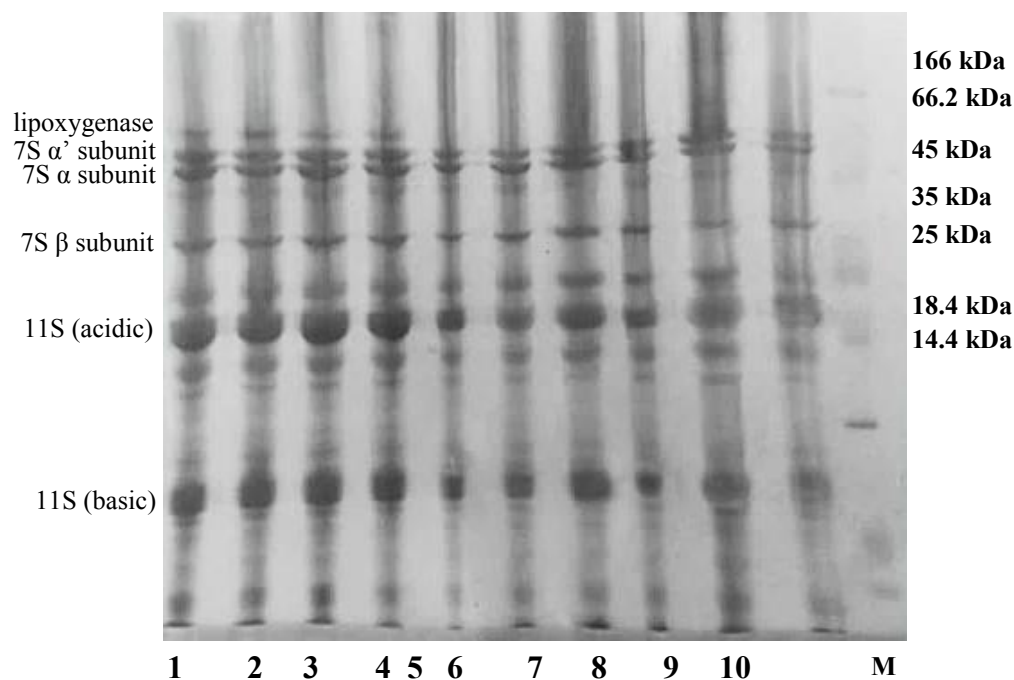


شود.

### ۳-۶- الکتروفورز

الگوی الکتروفورز مخلوط و کانجوگه SPI و CMC مورد بررسی قرار گرفت تا تشکیل پیوند کووالان بین پروتئین و پلی ساکارید توسط پلاسمای اثبات گردد. همانگونه که در شکل ۴ می توان مشاهده نمود، زیرواحدهای  $\alpha$ ،  $\alpha'$  و  $\beta$  بتاگانگلایسینین به ترتیب با وزن مولکولی ۶۷، ۷۱ و ۵۰ کیلودالتون به خوبی قابل مشاهده هستند. همچنین زیرواحدهای گلایسینین شامل پلی پپتید اسیدی با وزن مولکولی ۳۸ کیلودالتون و پلی پپتید بازی با وزن مولکولی ۲۰ کیلودالتون به خوبی دیده می شوند [۱۹].

یکی از مهم ترین پیکها مربوط به پیوند هیدروژنی است که در محدوده  $3000-3500\text{ cm}^{-1}$  رخ می دهد. با توجه به نتایج به دست آمده، این پیک در SPI و CMC به ترتیب در طول موج  $3284\text{ cm}^{-1}$  و  $3306\text{ cm}^{-1}$  مشاهده می شود. این در حالی است که پیک پیوند هیدروژنی مربوط به کانجوگه SPI و CMC به صورت کمی تیزتر در ناحیه  $3294\text{ cm}^{-1}$  ظاهر می شود و نشان دهنده تغییرات در پیوندهای هیدروژنی می باشد. کیو و همکاران (۲۰۱۸) نیز گزارش کرده اند که انتقال پیک کانجوگه به طول موج های بالاتر از ایزوله پروتئینی، افزایش تعداد پیوندهای هیدروژنی در کانجوگه طی پلیمریزاسیون را نشان می دهد [۵]. بنابراین این تغییر می تواند به اتصال CMC به SPI نسبت داده



**Fig 4** Effect of DBD plasma treatment on the SDS-PAGE patterns of SPI-CMC mixture and conjugate. (M column is marker and Columns 1 to 10 are related to SPI-CMC mixture, treatment at 16 kV for 5 min, 16 kV for 10 min, 16 kV for 15 min, 18 kV for 5 min, 18 kV for 10 min, 18 kV for 15 min, 20 kV for 5 min, 20 kV for 10 min and 20 kV for 15 min, respectively.)

در ژل بالای می تواند مربوط به برهمکنش پروتئین و پلی ساکارید پس از تیمار با پلاسما باشد که منجر به تغییر در ساختار پروتئین شده است [۲۸]. الگوی الکتروفورزی به دست آمده با نتایج حاصل از درجه پیوندی (شکل ۳) مطابق می باشد. جی و همکاران (۲۰۲۰) نیز نواحی تیره ای را در بالای ژل پائینی پس از تیمار با پلاسما مشاهده کردند که آن را به پیوند بین ایزوله

با افزایش زمان و ولتاژ اعمال پلاسما، باندهای گلیکوپروتئینی به تدریج کم رنگ شده (خطوط ۱۰-۲) و نواحی تیره رنگی در بالای ژل جدا کننده پدیدار می شوند (خطوط ۱۰-۵). این تغییرات با افزایش ولتاژ به ۱۸ و ۲۰ کیلوولت مشهودتر است. همچنین، باند مربوط به لیپوکسیگناز در کانجوگه های تیمار شده در ۱۸ و ۲۰ کیلوولت مشاهده نمی شود. نواحی تیره قابل مشاهده

- Sonochemistry, 42: 250-259.
- [6] Fridman, A. and Kennedy, L.A. 2004. Plasma physics and engineering. CRC press.
- [7] Segat, A., Misra, N., Cullen, P. and Innocente, N. 2015. Atmospheric pressure cold plasma (ACP) treatment of whey protein isolate model solution. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 29: 247-254.
- [8] Dong, S., Gao, A., Xu, H. and Chen, Y. 2017. Effects of dielectric barrier discharges (DBD) cold plasma treatment on physicochemical and structural properties of zein powders. *Food and Bioprocess Technology*, 10(3): 434-444.
- [9] Lee, K.H. et al. 2016. Evaluation of cold plasma treatments for improved microbial and physicochemical qualities of brown rice. *LWT*, 73: 442-447.
- [10] Ji, H. et al. 2020. Improved physicochemical properties of peanut protein isolate glycosylated by atmospheric pressure cold plasma (ACP) treatment. *Food Hydrocolloids*, 109: 106124.
- [11] Ekezie, F.-G.C., Sun, D.-W. and Cheng, J.-H. 2019. Altering the IgE binding capacity of king prawn (*Litopenaeus Vannamei*) tropomyosin through conformational changes induced by cold argon-plasma jet. *Food Chemistry*, 300: 125143.
- [12] Puppo, C. et al. 2004. Physicochemical modifications of high-pressure-treated soybean protein isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(6): 1564-1571.
- [13] Pearce, K.N. and Kinsella, J.E. 1978. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26(3): 716-723.
- [14] Diftis, N. and Kiosseoglou, V. 2003. Improvement of emulsifying properties of soybean protein isolate by conjugation with carboxymethyl cellulose. *Food Chemistry*, 81(1): 1-6.
- [15] Bertram, H.C., Kohler, A., Böcker, U., Ofstad, R. and Andersen, H.J. 2006. Heat-induced changes in myofibrillar protein structures and myowater of two pork qualities. A combined FT-IR spectroscopy and low-field NMR relaxometry study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(5): 1740-1746.
- [16] Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural

پروتئین نخود و دکستران ارتباط دادند. علاوه بر این، آنها باند پهن ایجاد شده در پایین ژل را در اثر شکل گیری زیرواحدهای با وزن مولکولی کم در اثر بمباران پلاسما می دانستند [۱۰]. این باند نه تنها پس از تیمار مخلوط SPI و CMC با پلاسما مشاهده شد بلکه زمانی که SPI به تنهایی تحت تیمار پلاسما قرار گرفت، این باند در آن به وجود آمد (نتایج نشان داده نشده است).

#### ۴- نتیجه گیری

بر اساس نتایج به دست آمده از این پژوهش می توان دریافت که پلاسمای سرد فشار اتمسفری قادر به تشکیل کانجوگه بین SPI و CMC می باشد. هرچند میزان تشکیل این کانجوگه ها به ولتاژ و زمان اعمال پلاسما بستگی دارد. استفاده از روش پلاسمای سرد برای تولید کانجوگه پروتئین-پلی ساکارید می تواند برخلاف روش متداول تولید این ترکیب (روش مایلارد) در مدت زمانی کوتاه انجام شده و از تشکیل ترکیبات جانبی سرطانزا که در واکنش های مایلارد تولید می شوند، جلوگیری نماید.

#### ۵- منابع

- [1] Chen, W. et al. 2019. Preparation of modified whey protein isolate with gum acacia by ultrasound maillard reaction. *Food Hydrocolloids*, 95: 298-307.
- [2] Xue, F., Li, C., Zhu, X., Wang, L. and Pan, S. 2013. Comparative studies on the physicochemical properties of soy protein isolate-maltodextrin and soy protein isolate-gum acacia conjugate prepared through Maillard reaction. *Food Research International*, 51(2): 490-495.
- [3] Semenova, M. et al. 2014. Protein-polysaccharide interactions and digestion of the complex particles, Food structures, digestion and health. Elsevier, pp. 169-192.
- [4] Yokoyama, K., Nio, N. and Kikuchi, Y. 2004. Properties and applications of microbial transglutaminase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(4): 447-454.
- [5] Qu, W. et al., 2018. Effects of ultrasonic and graft treatments on grafting degree, structure, functionality, and digestibility of rapeseed protein isolate-dextran conjugates. *Ultrasonics*

- V. 2005. Rheological properties and stability of model salad dressing emulsions prepared with a dry-heated soybean protein isolate-dextran mixture. *Food Hydrocolloids*, 19(6): 1025-1031.
- [24] Kong, J. and Yu, S. 2007. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 39(8): 549-559.
- [25] Lin, O.H., Kumar, R.N., Rozman, H. and Noor, M.A.M. 2005. Grafting of sodium carboxymethylcellulose (CMC) with glycidyl methacrylate and development of UV curable coatings from CMC-g-GMA induced by cationic photoinitiators. *Carbohydrate Polymers*, 59(1): 57-69.
- [26] Su, J.-F., Huang, Z., Yuan, X.-Y., Wang, X.-Y. and Li, M. 2010. Structure and properties of carboxymethyl cellulose/soy protein isolate blend edible films crosslinked by Maillard reactions. *Carbohydrate Polymers*, 79(1): 145-153.
- [27] Bagheri, L., Yarmand, M., Madadlou, A. and Mousavi, M.E. 2014. Transglutaminase-induced or citric acid-mediated cross-linking of whey proteins to tune the characteristics of subsequently desolvated sub-micron and nano-scaled particles. *Journal of Microencapsulation*, 31(7): 636-643.
- [28] Li, R. et al., 2019. Relationship between surface functional properties and flexibility of soy protein isolate-glucose conjugates. *Food Hydrocolloids*, 95: 349-357.
- proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259): 680.
- [17] Li, Y. et al. 2013. Functional properties of Maillard reaction products of rice protein hydrolysates with mono-, oligo- and polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 30(1): 53-60.
- [18] Desmet, T. et al. 2009. Nonthermal plasma technology as a versatile strategy for polymeric biomaterials surface modification: a review. *Biomacromolecules*, 10(9): 2351-2378.
- [19] Ma, X. et al. 2020. Comparison of citrus pectin and apple pectin in conjugation with soy protein isolate (SPI) under controlled dry-heating conditions. *Food Chemistry*, 309: 125501.
- [20] Kato, A. 2002. Industrial applications of Maillard-type protein-polysaccharide conjugates. *Food Science and Technology Research*, 8(3): 193-199.
- [21] Mu, L. et al. 2010. Effect of ultrasonic treatment on the graft reaction between soy protein isolate and gum acacia and on the physicochemical properties of conjugates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(7): 4494-4499.
- [22] Kato, A. 1996. Preparation and functional properties of protein-polysaccharide conjugates. *Surface activity of proteins: Chemical and Physicochemical Modifications*: 115-129.
- [23] Diftis, N., Biliaderis, C. and Kiosseoglou,



## Production of soy protein isolate - carboxymethylcellulose conjugate through non-thermal plasma

Sharafodin, H. <sup>1</sup>, Soltanizadeh, N. <sup>2\*</sup>

1. M.Sc., Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.
2. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><b>Article History:</b></p> <p>Received 2021/ 08/ 13 Accepted 2022/ 05/31</p> <hr/> <p><b>Keywords:</b></p> <p>DBD plasma, Soy protein, carboxymethylcellulose, Conjugate.</p>	<p>The aim of the present study was to investigate the possibility of the soy protein isolate-carboxy methylcellulose conjugate via non-thermal plasma. Therefore, a 1: 1 mixture of soy protein isolate and carboxymethylcellulose was treated with DBD plasma for 5, 10 and 15 min under the voltages of 16, 18, and 20 kV. Then, the solubility, Emulsifying activity and emulsion stability, the average particle size of the emulsion, the glycation degree, the Fourier transform infrared spectrum (FTIR), and the electrophoretic pattern of the resulting complexes were investigated. The results of electrophoresis, FTIR, and glycation degree proved the formation of soy protein isolate-carboxymethylcellulose conjugate after plasma treatment. The amount of conjugate formation depends on voltage and time of plasma treatment. The resulting conjugates had significant solubility and emulsifying activity compared to the mixture of these two compounds (<math>p &lt; 0.05</math>). The smallest droplet size of emulsion was observed in 18 kV treatment for 5 min, which has better stability over time compared to the mixture of soy protein-carboxymethyl cellulose. In general, it can be said that the non-thermal plasma process is able to rapidly form a protein-polysaccharide conjugate with a very good emulsifying ability.</p>
<p><b>DOI:</b> 10.22034/FSCT.19.126.257 <b>DOR:</b> 20.1001.1.20088787.1401.19.126.8.9</p> <hr/> <p>*Corresponding Author E-Mail: <a href="mailto:soltanizadeh@iut.ac.ir">soltanizadeh@iut.ac.ir</a></p>	