بهینه سازی شرایط تشکیل کمپلکس صمغ فارسی– ایزوله پروتئین آب پنیر

نسیم رئوفی[۱*]، رسول کدخدایی[۲] ، مسعود نجف نجفی[۳]

۱- دکتری تخصصی مهندسی مواد غذایی، گروه نانوفناوری مواد غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران
۲- دانشیار گروه پژوهشی نانوفناوری مواد غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران
۳- گروه صنایع غذایی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۴/۱۱/۰۵ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۲/۱۰)

چکیده

صمغ فارسی یک صمغ آنیونی است که به طور طبیعی از درخت بادام کوهی ترشح می‌شود. متاسفانه اطلاعاتی در خصوص اتصالات این صمغ با پروتئین‌های حرارت‌دیده در دسترس نیست. هدف از این تحقیق بررسی اثر اعمال حرارت بر ویژگی ایزوله پروتئین آب پنیر و کمپلکس‌های حاصله با صمغ فارسی می‌باشد. بدین منظور ابتدا اثر مدت زمان اعمال تیمار حرارتی ۸۰ درجه سانتی‌گراد بر کدورت پروتئین (pH = ٤) و سپس بر ویژگی کمپلکس‌های حاصله به عنوان تابعی از زمان حرارت‌دهی پروتئین (۰ تا ۳۵ دقیقه) بررسی شد. سپس اثر زمان حرارت‌دهی (۱۵، ۲۵ و ۳۵ دقیقه) و نسبت پروتئین حرارت‌دیده به صمغ فارسی (۲:۱، ۱:۱، ۱:۲، ۱:۵، ۱:۱۰ و ۱:۲۰) بر میزان ترکیبات تشکیل‌دهنده دو فاز مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که با افزایش زمان حرارت‌دهی، کدورت نمونه‌های پروتئین به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد. اما این محلول‌ها به دلیل تشکیل توده‌های پروتئینی ناشی از برهم‌کنش پروتئین–پروتئین، بسیار ناپایدار بودند. افزودن صمغ فارسی باعث تشکیل کمپلکس‌های پروتئین–پلی‌ساکارید و افزایش معنی‌داری در پایداری آن‌ها شد. رفتار جریان کمپلکس‌ها رفتار رقیق‌شونده با برش همراه با ایجاد حلقه هیسترزیس در منحنی‌های رفت و برگشت و افزایش چشمگیری در ویسکوزیته (در درجه برش ۰ تا $۱۰۰s^{-1}$) نسبت به محلول‌های شاهد بود که همگی تاییدی بر ایجاد کمپلکس بین صمغ و پروتئین تیماردیده است. بیشترین میزان بیوپلیمرها در فاز رسوب پس از ۳۵ دقیقه حرارت‌دهی حاصل شد و با افزایش نسبت صمغ به پروتئین، میزان صمغ در فاز رسوب و یا به عبارتی میزان کمپلکس‌های نامحلول افزایش پیدا کرد.

کلید واژگان: *آمیگدالوس اسکوپاریا، پروتئین آب پنیر، کدورت، کمپلکس، ویسکوزیته*

* مسئول مکاتبات: nsm_rf@yahoo.com

۱- مقدمه

پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها کاربردی‌ترین بیوپلیمرهای طبیعی در صنایع غذایی هستند [۱]. از آنجا که این دو بیوپلیمر اغلب به طور همزمان در صنایع غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند، دانستن اطلاعاتی راجع به برهم‌کنش آن‌ها به منظور کنترل ساختار و بافت مواد غذایی فرآوری شده حائز اهمیت است [۲ و ۳]. بنابراین کنترل و شناخت عمیق تر راجع به مکانیسم برهم‌کنش این بیوماکرومولکول‌ها عوامل مهمی است که منجر به توسعه روش‌های فرآوری مواد غذایی می‌شود [٤].

وقتی پروتئین‌های آب پنیر در معرض فرآیندهای حرارتی قرار می‌گیرند، بسته به شرایط حرارتی ممکن است دچار تغییرات ساختاری (دناتوراسیون) شوند که طی آن ساختار پروتئین باز شده و گروه‌های عاملی در دسترس قرار گیرند. اولین فراکسیونی که دناتوره می‌شود ایمونوگلبولین و پس از آن سرم‌آلبومین است. سپس توده‌های[1] کوچک بتالاکتوگلبولین تشکیل می‌شوند که اندازه آن‌ها در اثر افزایش دما یا زمان حرارت‌دهی به مرور افزایش پیدا می‌کند. در نهایت با افزایش دما یا زمان حرارت‌دهی، دناتوراسیون آلفالاکتالبومین که مقاوم‌ترین فراکسیون پروتئین آب پنیر است آغاز می‌شود [۵ و ٦]. بنابراین ممکن است در برخی موارد هنگام حرارت دادن و فرآوری محصولات حاوی پروتئین، توده‌ای شدن ثانویه رخ دهد و منجر به ایجاد بافت شنی[2] شود. افزودن پلی‌ساکاریدها به این سیستم‌ها چه از طریق ایجاد حفاظ در برابر گروه‌های باردار پروتئین و چه از طریق بالا بردن ویسکوزیته محیط و کاهش سرعت برهم‌کنش پروتئین‌ها، باعث به حداقل رساندن بر هم‌کنش‌های پروتئین-پروتئین شده و از توده‌ای شدن بیشتر آن‌ها جلوگیری می‌کند. کایبارا و همکاران (۲۰۰۰) نشان دادند که در سیستم‌های حاوی بتالاکتوگلبولین و پلی دی متیل دی آلیل آمونیم، حرارت‌دهی تا دمای بالای ۵۰ درجه سانتی‌گراد باعث دناتوراسیون حرارتی و باز شدن ساختار پروتئین می‌شود. به این ترتیب برهم‌کنش‌های هیدروفوبی افزایش یافته و باعث تشکیل شدن کمپلکس‌ها می‌شوند [۷].

1. aggregate
2. gritty texture

محلول‌های پروتئین- پلی‌ساکارید از لحاظ ترمودینامیکی می‌توانند سازگار یا ناسازگار باشند. در حالت ناسازگاری ترمودینامیکی، دو بیوپلیمر با یکدیگر برهم‌کنش نمی‌دهند و به صورت دو فاز مجزا از یکدیگر جدا می‌شوند. اما در حالت سازگاری ترمودینامیکی دو نوع محلول به دست می‌آید: ۱- یک فاز پایدار و هموژن حاوی دو بیوپلیمر و ۲- سیستم دو فاز که بیوپلیمرها در فاز رسوب با یکدیگر بر هم کنش داده‌اند. در حالت دوم به دلیل جاذبه‌های الکترواستاتیک بین بیوپلیمرها کمپلکس یا کواسرواسیون مرکب اتفاق می‌افتد. این برهم‌کنش‌ها در pH زیر نقطه ایزوالکتریک پروتئین‌ها رخ داده و در حقیقت اتصالات بین گروه‌های عملگرای با بار مخالف موجود بر سطح پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها است که منجر به تشکیل ساختارهای پیچیده‌ای مثل کمپلکس‌ها، توده‌های پروتئینی و کواسروات‌ها می‌شود [۸]. نسبت پروتئین به پلی‌ساکارید، pH ، غلظت کلی، وزن مولکولی بیوپلیمرها و قدرت یونی محیط مهم‌ترین عواملی هستند که بر سازگاری پروتئین-پلی‌ساکارید و ویژگی کمپلکس‌های به وجود آمده اثر می‌گذارند [۹ و ۱۰].

یکی از صمغ‌های بومی ایران که اخیرا مورد توجه محققین قرار گرفته است صمغ فارسی (زدو[3] و یا انگوم[4]) نام دارد. این صمغ جزو صمغ‌های ترشحی[5] شفافی است که از درخت بادام کوهی یا ارژن با نام علمی *آمیگدالوس اسکوپاریا اسپاچ*[6] در اثر تنش‌های دمایی، رطوبتی، گزش حشرات، بیماری صمغ‌زایی قارچی[7] و غیره به دست می‌آید [۱۱ و ۱۲]. این صمغ در قسمت‌های مختلف یک درختچه دارای رنگ‌های متفاوتی است و همچنین اغلب رنگ صمغی که در مناطق گرمسیری به دست می‌آید روشن‌تر از مناطق سردسیر است. از این لحاظ آن را به دو درجه تقسیم‌بندی می‌کنند: درجه یک به رنگ سفید تا کرم است (که اصطلاحا جوهر نامیده می شود) که فاقد مواد خارجی و انگوم سیاه است و درجه دو به رنگ زرد و قرمز (معروف به انگوم معمولی) است که می‌تواند تا ۵٪ مواد خارجی و ۵٪ نیز انگوم سیاه باشد. از نظر شیمیایی یک پلی‌ساکارید آنیونی با pH حدود

3. Zedo
4. Angum
5. Exudate gums
6. Amygdalus scoparia Spach
7. fungalgummiosis

۵/۵ است که حاوی دو بخش محلول (۳۰-۲۵٪) و نامحلول (۷۵-۷۰٪) در آب می‌باشد و قسمت اعظم آن از واحدهای گلوکز و آرابینوز تشکیل شده است.

متاسفانه تحقیقات محدودی جهت شناخت مکانیسم برهم‌کنش پروتئین آب پنیر- صمغ فارسی در دسترس است. دانستن این اطلاعات می‌تواند جهت استفاده از آن در آینده در سیستم‌های واقعی حائز اهمیت باشد. هدف از این تحقیق تعیین اثر مدت زمان حرارت‌دهی پروتئین بر ویژگی کمپلکس‌های متشکل از آن با صمغ فارسی و همچنین تعیین بهترین نسبت مخلوط کردن این دو بیوپلیمر در سیستم‌های آبی است به نحوی که بیشترین میزان برهم‌کنش و بالاترین پایداری را ایجاد کنند.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

صمغ فارسی (۵/۰۵ ٪ رطوبت، ۱/٦۷ ٪ خاکستر، ۰/۲۱٪ پروتئین و ۹۸/۰۹ ٪ کربوهیدرات) از درختان بادام کوهی که در استان شیراز (کازرون) رشد کرده‌اند جمع‌آوری شد. صمغ خام پس از شستشو خشک و آسیاب شده و سپس توسط الک ۳۰ میکرون غربال شد تا اندازه ذرات یکسانی به دست آید. ایزوله پروتئین آب پنیر از شرکت داویسکو (آمریکا) خریداری شد. حداقل درجه خلوص پروتئین بر اساس آنالیز شرکت سازنده، برابر با ۹٦/۲٪ (بر اساس وزن خشک)، ۱/٥٤ ٪ خاکستر سولفاته و ۵/۰٪ رطوبت بود. سدیم آزاید (به عنوان ماده نگهدارنده با درجه خلوص ۹۹/۵٪) و سدیم هیدروکسید از شرکت سیگما (آمریکا) و اسید کلریدریک آزمایشگاهی از شرکت مرک (آلمان) خریداری شد.

۲-۲- آماده‌سازی محلول‌های پروتئین آب پنیر و صمغ فارسی

جهت تولید محلول‌های ایزوله پروتئین آب پنیر و صمغ فارسی مقدار مشخصی از آن‌ها توزین و در آب دیونیزه به مدت دو ساعت توسط همزن مغناطیسی (ایکا، آلمان) با شدت ٤۰۰ دور در دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد همزده شد. سپس محلول‌ها به مدت یک شبانه روز در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند تا کاملا هیدراته گردند. به منظور جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌ها از سدیم آزاید ۰/۰۲٪ استفاده شد.

۲-۳- اعمال تیمار حرارتی بر محلول ایزوله پروتئین آب پنیر

۱۰ میلی لیتر محلول ۰/۱٪ ایزوله پروتئین آب پنیر در لوله آزمایش ریخته و pH آن‌ها در عدد ۷/۰ تنظیم شد. سر لوله‌ها توسط فویل آلومینیم بسته شد تا از تبخیر آب جلوگیری شود. نمونه‌ها به منظور حرارت‌دهی در بن ماری (جولابو، آمریکا) به مدت ۵ الی ۳۵ دقیقه تحت درجه حرارت ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و با قرار گرفتن در حمام یخ، سریعا به دمای محیط رسیدند. سپس pH آن‌ها به کمک اسید کلریدریک در ٤ تنظیم شده و کدورت محلول‌ها بلافاصله پس از تولید (کدورت اولیه) و پس از ۲٤ ساعت نگهداری در دمای آزمایشگاه (کدورت ثانویه) مورد ارزیابی قرار گرفت.

۲-٤- تهیه پراکنش‌های مخلوط بیوپلیمرها

ابتدا پراکنش‌های صمغ فارسی و محلول‌های تیمار دیده ایزوله پروتئین آب پنیر (و همچنین محلول تیمار ندیده پروتئین به عنوان نمونه شاهد) به طور جداگانه توسط اسید کلریدریک و هیدروکسید سدیم ۱ و ۰/۱ نرمال در pH = ٤ تنظیم شدند. مخلوط‌های پروتئین-پلی ساکارید در غلظت ۰/۱ و نسبت پروتئین به صمغ برابر با ۱:۲۰ الی ۲:۱ در ۳ تکرار تهیه و توسط همزن مغناطیسی (ایکا، آلمان) به مدت ۱ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد مخلوط شدند.

۲-۵- سنجش کدورت

نمونه‌های ۰/۱٪ پروتئین آب پنیر و همچنین مخلوط‌های پروتئین- پلی‌ساکارید که مطابق بخش ۲-۳ و ۲-٤ آماده شده بودند، پس از ۱ ساعت (کدورت اولیه) و ۲٤ ساعت (کدورت ثانویه) نگهداری در دمای آزمایشگاه توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل CT-5700، شرکت ای-کروم تکنولوژی، تایوان) در طول موج ٦۰۰ نانومتر ارزیابی شدند. آزمایش در دمای محیط (۲° ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد) اندازه‌گیری و از آب مقطر به عنوان نمونه شاهد استفاده شد.

۲-۶- اندازه‌گیری ویسکوزیته و حلقه هیسترزیس

خصوصیات رفتار جریان محلول پروتئین که به مدت ۲۵ دقیقه تحت تیمار حرارتی قرار گرفته بود، محلول صمغ فارسی و محلول کمپلکس این دو توسط ویسکومتر چرخشی (بروکفیلد، آمریکا) با اسپیندل SC4-18 در دمای ۰/۵ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد تحت درجه برش S^{-1} ۱۰۰-۱۰ به صورت رفت و برگشت تعیین و حلقه هیسترزیس بر اساس تفاوت انتگرال منحنی رفت و برگشت محاسبه شد. غلظت تمامی نمونه ها ۰/۱٪ بود و برای هر نمونه ۶/۸ میلی لیتر از محلول مورد آزمایش قرار گرفت. همچنین در خصوص محلول کمپلکس، نسبت صمغ : پروتئین برابر با ۱:۱۰ (r = ۰/۱) بود.

۲-۷- درصد ترکیبات تشکیل دهنده دو فاز

میزان کربوهیدرات و پروتئین دو فاز (فاز روشناور و فاز رسوب) مخلوط‌های صمغ-پروتئین پس از نگهداری به مدت ۲۴ ساعت، تعیین شد. محتوای پروتئین توسط آزمایش لوری و رسم منحنی استاندارد سرم‌آلبومین گاوی و محتوای پلی‌ساکارید با استفاده از آزمایش فنل-سولفوریک اسید تعیین شد.

جهت انجام آزمایش لوری ۲ میلی لیتر نمونه با ۲/۸ میلی لیتر محلول لوری (کربنات سدیم: سولفات مس: تارتارات مضاعف سدیم-پتاسیم به نسبت ۱:۱:۱۰۰) مخلوط و ورتکس و به مدت ۲۰ دقیقه در محیط تاریک قرار داده شد. سپس به آن ۰/۴ میلی لیتر محلول رقیق شده فولین (فولین:آب دیونیزه به نسبت ۵:۶) اضافه و ورتکس شد و به مدت ۳۰ دقیقه دیگر در محیط تاریک استراحت داده شد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر انجام شد.

آزمایش فنل سولفوریک اسید به این نحو انجام شد که به ۱ میلی‌لیتر از نمونه ۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ و ۱ میلی‌لیتر محلول فنل ۵٪ اضافه و کاملا ورتکس شد و بعد از ۲۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه، جذب با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل CT-5700، شرکت ای-کروم تکنولوژی، تایوان) در طول موج ۴۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

جهت تعیین درصد رسوب هر بیوپلیمر (پروتئین و یا کربوهیدرات)، از فرمول زیر استفاده شد:

$$B_c = \frac{B_p}{B_s + B_p} \times 100$$

که در آن B_c فراکسیون بیوپلیمر در فاز رسوب، B_p مقدار بیوپلیمر محاسبه شده در فاز رسوب و B_s مقدار بیوپلیمر محاسبه شده در فاز روشناور است.

۲-۸- آزمون آماری

طرح آماری مورد استفاده طرح کاملا تصادفی در قالب آزمایشات فاکتوریل بود. آنالیز آماری بر اساس آنالیز واریانس (ANOVA) و آزمون مقایسه‌ای چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ برای مقایسه میانگین‌ها مورد استفاده قرار گرفت. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار اکسل و Design Expert استفاده شد و تمامی آزمون‌ها حداقل با ۳ تکرار انجام شدند.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- پایداری محلول‌های پروتئین

شکل ۱ اثر زمان حرارت‌دهی محلول ایزوله پروتئین آب پنیر در pH = ۷ و سپس تغییر pH به ۴ را بر میزان کدورت اولیه (۱ ساعت پس از تولید) و کدورت ثانویه (۲۴ ساعت پس از تولید) محلول نشان می‌دهد. همان‌طور که مشخص است با افزایش مدت زمان حرارت‌دهی، کدورت اولیه محلول‌ها نسبت به نمونه شاهد افزایش چشمگیری پیدا کرده ($P < ۰/۰۵$) به طوری که با ۲۵ دقیقه حرارت دادن به ماکزیمم خود رسیده است. از آن جا که بین کدورت و اندازه ذرات رابطه مستقیمی برقرار است دلیل این امر را می‌توان تشکیل توده‌های بزرگ بتالاکتوگلبولین دانست. بنابراین می‌توان این طور نتیجه‌گیری کرد که حداکثر برهم‌کنش‌های پروتئین-پروتئین و تشکیل توده‌ها پس از ۲۵ دقیقه حرارت دادن در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد حاصل می‌شود. از این زمان به بعد روند کدورت اولیه کاهشی است که امکان دارد به دلیل دناتوره شدن آلفالاکتالبومین و تغییر آرایش فضایی پروتئین‌های دناتوره باشد به نحوی که توده‌های تشکیل شده اندازه کوچکتری داشته و شرایط به سمت پایداری بالاتر پیش می‌رود.

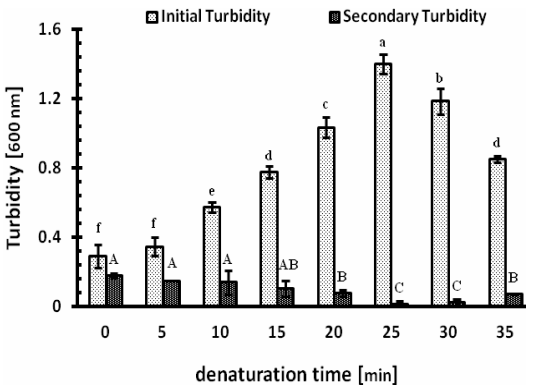

Fig 1 The effect of heat treatment on the initial and secondary turbidities of whey protein isolate (0.1%) at pH 4.0 (different lower-case and upper-case letters denote significant differences ($p < 0.05$) of initial and secondary turbidities, respectively (n=3).

در شکل ۱ مشاهده می‌شود که کدورت ثانویه در کلیه نمونه‌های حرارت دیده و همچنین در نمونه شاهد کاهش یافت. زیرا همان طور که گفته شد در pH نزدیک به نقطه ایزوالکتریک پروتئین، نیروهای الکترواستاتیک در حداقل ممکن خود بوده و مقدار آب کمتری با مولکول‌های پروتئین برهم‌کنش می‌کنند؛ از این رو برهم‌کنش‌های پروتئین-پروتئین افزایش می‌یابد که منجر به تشکیل توده‌های بزرگ پروتئین می‌شود که بسیار ناپایدار بوده و رسوب می‌کنند [۳]. از طرف دیگر حرارت‌دهی باعث باز شدن ساختار پروتئین نیز می‌شود و در نتیجه گروه‌های آبگریز بیشتری در دسترس قرار می‌گیرند که خود باعث افزایش برهم‌کنش‌های پروتئین-پروتئین شده و به ناپایداری و رسوب آن‌ها کمک می‌کند.

نکته قابل توجه این است که پس از ۲۴ ساعت نگهداری مقداری کدورت در تمامی نمونه‌ها مشاهده می‌گردد. به این معنی که بخشی از پروتئین برهم‌کنش نداده و به صورت محلول وجود دارد. در مورد نمونه‌ای که به مدت ۲۵ دقیقه تحت حرارت قرار گرفته بود کمترین میزان کدورت ثانویه مشاهده می‌گردد که نشان می‌دهد میزان پروتئین‌های محلول موجود در آن حداقل ممکن است.

۳-۲- مقایسه پراکنش مخلوط بیوپلیمرها

با توجه به شکل ۲ مشخص شد که روند کلی کدورت اولیه پراکنش‌های صمغ-پروتئین متناسب با کدورت‌های اولیه نمونه‌های خالص پروتئین بود. اما تفاوتی که در مورد پراکنش‌ها وجود دارد در مورد کدورت ثانویه است. بر طبق فرضیات سانچز و پاکوین (۱۹۹۷) در pH نزدیک به نقطه ایزوالکتریک پروتئین، جاذبه بین پروتئین‌ها حداکثر است و توده‌های بزرگی تشکیل می‌شوند. اما با اضافه کردن صمغ به این سیستم‌ها از توده‌ای شدن پروتئین جلوگیری شده و اندازه کمپلکس نیز کاهش پیدا می‌کند [۱۳]. در اینجا نیز افزودن صمغ فارسی به محلول پروتئین حرارت‌دیده باعث افزایش چشمگیری در پایداری و جلوگیری از رسوب پروتئین‌ها در تمامی نمونه‌ها شد که این نشان‌دهنده برهم‌کنش میان پروتئین و صمغ فارسی است. با وجود اینکه میزان تفاوت بین کدورت اولیه و کدورت ثانویه در مورد همگی نمونه‌ها تقریبا برابر است اما بیشترین میزان کدورت (اولیه و ثانویه) در نمونه‌هایی که پروتئین به مدت ۲۵ دقیقه در معرض حرارت بود مشاهده گردید.

از طرف دیگر با مقایسه شکل‌های ۱ و ۲ مشاهده می‌گردد که عموما کدورت اولیه کمپلکس‌های پروتئین-پلی‌ساکارید کمتر از کدورت محلول پروتئین تیمار دیده است که این موضوع بار دیگر تشکیل شدن ذرات جدید کمپلکس که اندازه کوچکتری نسبت به توده‌های پروتئینی دارند را تایید می‌کند. به طور کلی از نمودارهای ۱ و ۲ این گونه استنباط می‌شود که حداکثر برهم‌کنش و پایداری کمپلکس‌ها در مدت زمان ۱۵ الی ۳۵ دقیقه اتفاق می‌افتد. از این رو در ادامه آزمایشات این بازه زمانی جهت بهینه‌سازی مورد بررسی قرار گرفت.

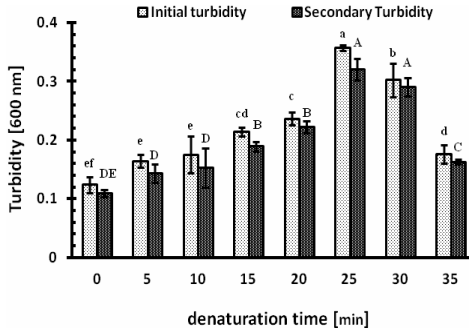

Fig 2 Initial and secondary turbidities of whey protein isolate-Persian gum complex at pH 4.0 as a function of heating time (different lower-case and upper-case letters denote significant differences ($p < 0.05$) of initial and secondary turbidities, respectively (n=3).

۳-۳- بررسی رفتار جریان سیستم‌های حاوی صمغ فارسی و ایزوله پروتئین آب پنیر

خصوصیات رفتار جریان محلول پروتئین حرارت‌دیده، محلول صمغ فارسی و همچنین کمپلکس این دو در شکل ۳ نشان داده شده است. مشاهده می‌شود که محلول پروتئین رفتار نیوتنی را نشان می‌دهد در حالیکه صمغ فارسی سودوپلاستیک بوده و حلقه هیسترزیس به میزان جزئی بین منحنی‌های رفت و برگشت مشاهده می‌شود. اما زمانی که صمغ با پروتئین ایجاد کمپلکس می‌کند حلقه هیسترزیس بزرگتری تشکیل می‌شود.

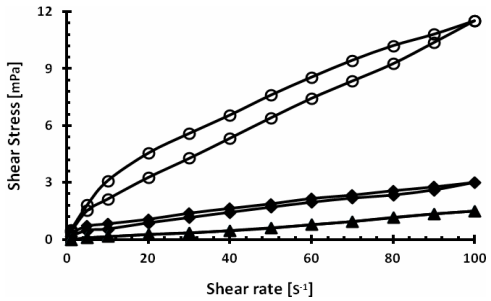

Fig 3 Flow behavior of (▲) heated whey protein isolate, (◆) Persian gum and (○) their complex (0.1%)

حلقه هیسترزیس در تفسیر برهم‌کنش بیوپلیمرهای غذایی استفاده می‌شود. هرچه هیسترزیس بیشتر باشد اثر سینرژیست بیشتر است [۱٤ و ۱۵]. صمغ فارسی در pH = ٤ دارای بار منفی است که می‌توانند از طریق برهم‌کنش‌های الکترواستاتیک به مناطق مثبت پروتئین آب پنیر متصل شوند. به همین دلیل به نظر می‌رسد که این اثر سینرژیستی مهم‌ترین دلیل ایجاد حلقه هیسترزیس در این سیستم‌ها باشد. بوریت و همکاران (۱۹۹۹) روی اثر سینرژیستی میسل‌های کازئین و صمغ‌های گالاکتومانان (صمغ دانه خرنوب و گوار) تحقیقاتی انجام دادند. آن‌ها متوجه شدند وقتی غلظت کلی بیوپلیمرها افزایش می‌یابد حلقه هیسترزیس یا تیکسوتروپیک ظاهر می‌شود و نتیجه گرفتند که پیدایش این اثر سینرژیستی به دلیل آن است که ویسکوزیته مخلوط گالاکتومانان و میسل‌های کازئینی به طور چشمگیری بالاتر از مجموع ویسکوزیته‌های هر یک از اجزای موجود در سیستم در همان غلظت می‌باشد [۱٤ و ۱۵].

ویسکوزیته محلول‌های توضیح داده شده در شکل ۳ به عنوان تابعی از درجه برش در شکل ٤ نمایش داده شده است. غلظت در تمامی محلول‌ها برابر است اما ویسکوزیته کمپلکس‌ها بیشتر از ویسکوزیته محلول‌های جداگانه صمغ و پروتئین است که حاکی از برهم‌کنش‌های الکترواستاتیک است [۱٦]. به استثنای محلول پروتئین که ویسکوزیته آن با افزایش درجه برش به میزان جزئی افزایش یافته بود، محلول صمغ فارسی و فاز کمپلکس رفتار رقیق‌شوندگی را نشان دادند. با این تفاوت که رفتار جریان نمونه کمپلکس نسبت به نمونه صمغ فارسی، سودوپلاستیک‌تر بود. این امر ثابت می‌کند که صمغ‌ها عامل اصلی رفتار سودوپلاستیک در محلول کمپلکس پروتیئن-صمغ هستند. به علاوه در شکل ٤ مشاهده می‌شود که در نمونه‌های کمپلکس بین منحنی‌های رفت و برگشت حلقه هیسترزیس در درجه برش‌های پایین وجود دارد. زیرا فاز کمپلکس دارای ساختارهایی است که نیاز به زمان دارد تا پس از تغییر شکل دوباره بازسازی شود. این ساختار احتمالا به دلیل برهم‌کنش‌های الکترواستاتیکی بین صمغ و پروتئین است که ممکن است در تغییر شکل پلی‌ساکارید اثرگذار باشد [۱٦]. در واقع زمانی که اگر نیروی جاذبه‌ای وجود نداشته باشد امکان دارد رفتار رقیق‌شوندگی مشاهده شود اما حلقه هیسترزیسی ایجاد نشود.

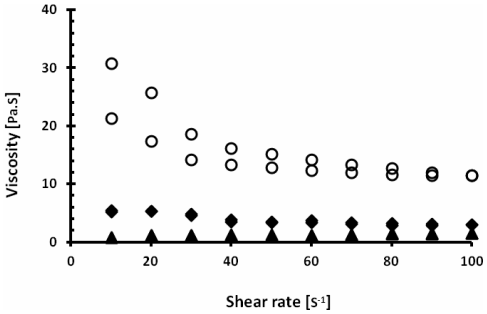

Fig 4 The viscosity of (▲) heated whey protein isolate, (◆) Persian gum and (○) their complex (0.1%) as a function of shear rate

۳-٤- بررسی شرایط تشکیل کمپلکس‌ها بر اساس تعیین مقدار پروتئین و کربوهیدرات در دو فاز

در سیستم‌های بیوپلیمری، جداسازی فاز به دلیل کاربردهایی که در صنایع غذایی، تغذیه و دارویی دارند موضوعات تحقیقاتی مهمی تلقی می‌شوند [۱۷ و ۱۸]. معمولا اولین قدم برای بررسی چنین سیستم‌های مایعی، محاسبه جبری غلظت بیوپلیمرها در دو

فاز روشناور و رسوب است. غلظت پلی‌ساکارید موجود در دو فاز را می‌توان با روشهایی مثل رفرکتومتری [۱۵] یا آنالیز تزریق جریان [۱۹] و یا روش فنل سولفوریک اسید [۲۵-۲۰] که متداول‌ترین آن‌ها است مشخص نمود. اساسا مخلوط کردن پروتئین با صمغ در pH پایین منجر به کاهش حلالیت صمغ می‌شود که دلیل آن برهم‌کنش الکترواستاتیک بین دو بیوپلیمر است. نسبت پروتئین به صمغ پارامتر مهمی در سیستم‌های بیوپلیمری است که تعادل بار ماکرومولکول‌ها و در نتیجه شدت برهم‌کنش‌های الکترواستاتیک را کنترل می‌کند. محاسبه میزان صمغ موجود در فاز رسوب اثری بر تشکیل کمپلکس‌ها ندارد. بنابراین جهت درک بیشتر پس از محاسبه مقدار پروتئین و صمغ در دو فاز، میانگین نسبت‌های پروتئین به پلی‌ساکارید در فاز رسوب نیز محاسبه شد.

جدول ۱ درصد پروتئین و صمغ را در هر دو فاز روشناور و فاز رسوب نشان می‌دهد. به طور کلی صمغ فارسی تحت هر شرایطی در هر دو فاز روشناور و رسوب دیده می‌شوند (در بهترین شرایط حدود ۱۷/۸۷ ٪ و در بدترین شرایط حدود ۳۸/۷۹ ٪ صمغ در فاز روشناور دیده می‌شود). علت آن می‌تواند حضور بخشی از صمغ در فاز محلول که با پروتئین برهم‌کنش نداشته و یا تشکیل کمپلکس‌های محلول صمغ - پروتئین باشد. چنین شرایطی قبلا برای کمپلکس‌های محلول سرم‌آلبومین گاوی - پلی (دی متیل دی آلیل آمونیم) کلراید نیز گزارش شده است [۲۶ و ۲۷].

Table 1 The percentage of complex as a function of heating time and the ration of protein to Persian gum (n=3)

Heating Time [min]	gum:protein ratio	Complexed fraction		Supernatant	
		Protein (%)	Persian gum (%)	Protein (%)	Persian gum (%)
15	0.05	88.17 ± 4.67	74.01 ± 4.67	11.83 ± 0.18	25.99 ± 0.18
15	0.10	87.26 ± 2.60	70.13 ± 2.60	12.74 ± 0.31	29.87 ± 0.31
15	0.20	90.94 ± 0.28	72.13 ± 0.28	9.06 ± 0.65	27.87 ± 0.65
15	0.50	87.60 ± 3.06	66.78 ± 3.06	12.40 ± 1.24	33.22 ± 1.24
15	1.00	84.87 ± 1.56	61.21 ± 1.56	15.13 ± 0.22	38.79 ± 0.22
15	2.00	96.27 ± 2.13	65.14 ± 2.13	3.73 ± 0.05	34.86 ± 0.05
25	0.05	83.02 ± 0.20	80.85 ± 0.20	16.98 ± 1.38	19.15 ± 1.38
25	0.10	81.17 ± 1.94	77.80 ± 1.94	18.83 ± 0.33	22.20 ± 0.33
25	0.20	84.25 ± 1.24	81.19 ± 1.24	15.75 ± 0.25	18.81 ± 0.25
25	0.50	82.49 ± 4.25	77.80 ± 4.25	17.51 ± 3.98	22.20 ± 3.98
25	1.00	89.80 ± 3.19	81.73 ± 3.19	10.20 ± 1.03	18.27 ± 1.03
25	2.00	86.19 ± 0.31	76.11 ± 0.31	13.81 ± 0.03	23.89 ± 0.03
35	0.05	92.66 ± 1.81	81.05 ± 1.81	7.34 ± 0.15	18.95 ± 0.15
35	0.10	94.25 ± 0.17	82.13 ± 0.17	5.75 ± 0.73	17.87 ± 0.73
35	0.20	85.69 ± 1.97	74.73 ± 1.97	14.31 ± 2.19	25.27 ± 2.19
35	0.50	86.54 ± 1.17	74.23 ± 1.17	13.46 ± 0.35	25.77 ± 0.35
35	1.00	86.60 ± 1.13	72.59 ± 1.13	13.40 ± 0.21	27.41 ± 0.21
35	2.00	90.93 ± 4.29	76.86 ± 4.29	9.07 ± 0.38	23.14 ± 0.38

شکل ۵ اثر مدت زمان اعمال تیمار حرارتی و نسبت پروتئین به صمغ موجود در کل مخلوط بر روی نسبت پروتئین به صمغ موجود در فاز رسوب را نشان می‌دهد. مشاهده می‌شود کمترین نسبت پروتئین به صمغ در فاز رسوب مربوط به مدت زمان ۲۵

دقیقه حرارت‌دهی می‌باشد که با مقایسه درصد بیوپلیمرها در جدول ۱ این موضوع با دقت بیشتری تایید می‌گردد. از طرفی در مدت زمان‌های کمتر یا بیشتر از ۲۵ دقیقه حرارت‌دهی نسبت پروتئین به صمغ در فاز رسوب افزایش پیدا کرده است. بیشترین نسبت پروتئین به صمغ (شکل ۵) و کمترین درصد صمغ (جدول ۱) در فاز رسوب مربوط به ۱۵ دقیقه حرارت‌دهی است که علت آن ممکن است باز نشدن کامل ساختار پروتئین و در نتیجه کاهش برهم‌کنش میان صمغ و پروتئین باشد. اما مقایسه درصد بیوپلیمرها در فاز رسوب در مورد دو زمان حرارت‌دهی ۲۵ و ۳۵ دقیقه (جدول ۱) نشان می‌دهد که میزان صمغ در هر دو زمان تفاوت چشمگیری ندارد ($P > ۰/۰۵$) ولی میزان پروتئین در فاز رسوب پس از ۳۵ دقیقه حرارت‌دهی بالاتر از مدت زمان ۲۵ دقیقه است. چنانچه در شکل ۲ مشاهده شد هر دو کمپلکس پروتئین-پلی‌ساکارید از پایداری نسبی بالایی برخوردار بودند اما کدورت کمپلکس‌های مربوط به زمان ۳۵ دقیقه کمتر از زمان ۲۵ دقیقه بود. می‌توان این گونه نتیجه‌گیری کرد که با افزایش زمان حرارت‌دهی، زنجیره‌های پروتئینی بیشتر باز شده و پروتئین‌های بیشتری با صمغ فارسی اتصال برقرار کرده‌اند. در نتیجه سهم پروتئین در فاز روشناور کمتر و میزان کدورت افت پیدا کرده است.

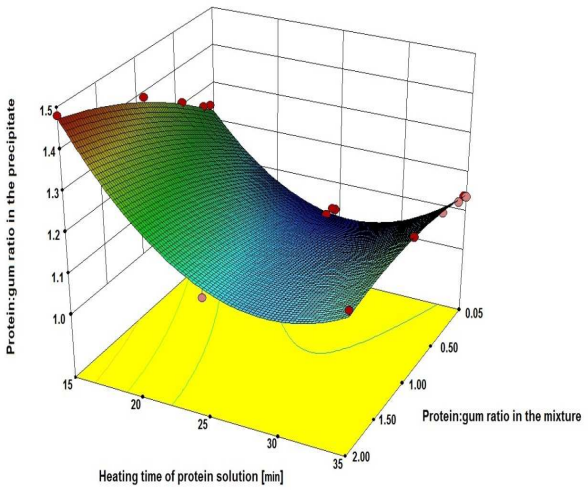

Fig 5 Changes in the ration of protein to polysaccharide in the precipitate as the function of heating time and protein to gum ratio

از طرف دیگر با افزایش نسبت صمغ به پروتئین در مخلوط، میزان صمغ در فاز رسوب نیز افزایش معنی‌داری پیدا کرده است ($P < ۰/۰۵$) درحالیکه میزان پروتئین در فاز رسوب و همچنین میزان صمغ و پروتئین در فاز روشناور تقریبا ثابت است. زیاد شدن صمغ در فاز رسوب به این معنا است که احتمالا با هر اتصال زنجیر صمغ آرایش فضایی پروتئین یا کمپلکس تغییر کرده و گروه عاملی دیگری را در دسترس قرار داده است اما بار غالب خنثی است که سبب تجمع و رسوب شده است. دلیل دیگر می‌تواند تجمع فاز نامحلول صمغ در توده‌های پروتئینی یا بین تجمعات کمپلکس‌ها باشد.

٤- نتیجه‌گیری کلی

در این تحقیق از ایزوله پروتئین آب پنیر که در زمان‌های متفاوتی تحت اعمال تیمار حرارتی قرار گرفته بود جهت تعیین ویژگی‌های کمپلکس پروتئین- صمغ فارسی مورد استفاده قرار گرفت. افزایش زمان حرارت‌دهی باعث افزایش کدورت محلول‌های پروتئین شد که دلیل آن باز شدن ساختار پروتئین و در دسترس قرار گرفتن گروه‌های عاملی بین زنجیره‌ای بود که در pH نزدیک به نقطه ایزوالکتریک (pH = ٤) با یکدیگر برهم‌کنش کرده و منجر به تشکیل توده‌های پروتئینی می‌شوند. این توده‌ها به دلیل اندازه بزرگی که دارند ناپایدار بوده و رسوب می‌کنند. آزمایشات نشان داد که بیشترین اندازه ذرات پس از ۲۵ دقیقه حرارت‌دهی محلول پروتئین ایجاد می‌شود. با افزودن صمغ فارسی به محلول‌های پروتئین پایداری قابل ملاحظه‌ای در اثر برهم‌کنش صمغ-پروتئین مشاهده شد که دلیل آن جلوگیری از توده‌های بزرگ پروتئینی و تشکیل کمپلکس‌های پروتئین-پلی‌ساکارید است که اندازه ذرات و کدورت کمتری نسبت به محلول‌های خالص پروتئین داشتند.

با وجود اینکه رفتار جریان محلول پروتئینی حرارت‌دیده رفتار نیوتنی بود، اما در مورد صمغ فارسی و همچنین مخلوط صمغ-پروتئین رفتار سودوپلاستیک مشاهده شد که نشان می‌دهد صمغ فارسی مسئول اصلی ایجاد رفتار سودوپلاستیک در کمپلکس‌های پروتئین آب پنیر- صمغ فارسی است. به علاوه در منحنی‌های رفت و برگشت نه تنها حلقه هیسترزیس در محلول کمپلکس

مشاهده شد بلکه ویسکوزیته این محلول‌ها نیز بسیار بالاتر از نمونه‌های خالص صمغ و پروتئین بود که هر دو مورد دلیلی بر اثبات برهم‌کنش صمغ فارسی و پروتئین آب پنیر می‌تواند باشد. با اندازه‌گیری درصد صمغ و پروتئین آب پنیر در فاز روشناور و فاز رسوب مشخص شد که هرچه نسبت صمغ فارسی در محیط افزایش می‌یابد، درصد صمغ در فاز روشناور تقریبا ثابت باقی مانده اما میزان صمغ در فاز رسوب افزایش می‌یابد. بنابراین با افزایش نسبت صمغ فارسی می‌توان میزان کمپلکس‌های نامحلول را افزایش داد. از طرف دیگر با افزایش مدت زمان حرارت‌دهی پروتئین آب پنیر نیز برهم‌کنش صمغ با پروتئین افزایش یافت که باعث ازدیاد میزان صمغ و پروتئین در فاز رسوب شد.

۵- منابع

[1] Jones, O.G., Lesmes, U., Dubin, P., McClements, D.J. (2010). Effect of polysaccharide charge on formation and properties of biopolymer nanoparticles created by heat treatment of β-lactoglobulin–pectin complexes, Food Hydrocolloids, 24: 374–383.

[2] Dickinson, E. (1995). Mixed biopolymers at interfaces. In Mixed Biopolymers (eds S.E. Harding, S.E., Hill, J.R. Mitchell), Nottingham University Press, Nottingham, pp. 349-372.

[3] Tolstoguzov, V. B. (1996). Structure-property relationships in foods. In Macromolecular interactions in food technology (eds N. Parris, A. Kato, L. K. Creamer, J. Pearce), ACS Symposium Series 650. Washington, DC: American Chemical Society, pp. 1-14.

[4] Gorji, S.G., Gorji, E.G., Mohammadifar, M. A. (2014). Characterisation of gum tragacanth (Astragalus gossypinus)/sodium caseinate complex coacervation as a function of pH in an aqueous medium, Food Hydrocolloids, 34:161-168.

[5] Jang, H. D., Swaisgood, H. E. (1990). Disulfide bond formation between thermally denatured b-lactoblobulin and k-casein in casein micelles. Journal of Dairy Science, 73: 900–904.

[6] Mutilangi, W.R.M., Kilara, A. (1985). Functional properties of heat denatured whey protein. I. Solubility. Milchwissenschaft, 40(6): 338-341.

[7] Kaibara, K., Okazaki, T., Bohidar, H. B., and Dubin, P. L. (2000). pH-Induced Coacervation in Complexes of Bovine Serum Albumin and Cationic Polyelectrolytes. Biomacromolecules 1, 100–107.

[8] Schmitt, C., Turgeon, S.L. (2011). Protein/polysaccharide complexes and coacervates in food systems. Advances in Colloid and Interface Science. 167: 63-70.

[9] Samant, S.K., Singhal, R.S., Kulkarn, P.R., Rege, D. (1993). Review. Protein–polysaccharide interactions: a new approach in food formulations. International Journal of Food Science and Technology.

[10] Shu, Y.-W., Sahara, S., Nakamura, S., Kato, A. (1996). Effects of the length of polysaccharide chains on the functional properties of the Millard-type lysozyme–polysaccharide conjugate. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 44: 2544-2548.

[11] Qian, H.F., Cui, S.W., Wange, Q., Wange, C., and Zhou, H.M. (2011). Fractionation and physicochemical characterization of peach gum polysaccharides. Food Hydrocolloids, 25: 1285–1290.

[12] Simas-Tosin, F.F., Barraza, R.R., Petkowicz, C.L.O., Silveira, J.L.M., Sassaki, G.L., Santos, E.M.R., Gorin, P.A.J. and Iacomini, M. (2010). Rheological and structural characteristics of peach tree gum exudates. Food Hydrocolloids, 24: 486–493.

[13] Sanchez, C., Paquin, P. (1997). Protein and protein–polysaccharide microparticles. In Damodaran, Food proteins and their applications. New York: Marcel Dekker, pp. 503–528.

[14] Bourriot. S., Garnier, C., Doublier, J. L. (1999). Phase separation. rheology and microstructure of micellar casein-guar gum mixtures. Food Hydrocolloids, 13: 43-49.

[15] Bourriot, S., Garnier, C., Doublier, J. L. (1999). Phase separation, rheology and structure of micellar casein–galactomannan mixtures. International Dairy Journal, 9: 353–357.

[16] Weinbreck, F., Wientjes, R.H.W., Nieuwenhuijse, H., Robijn, G.W., de Kruif, C.G. (2004). Rheological properties of whey

[22] Kim, H.-J., Decker, A.E., McClements, D.J. (2006). Preparation of multiple emulsions based on thermodynamic incompatibility of heat-denatured whey protein and pectin solutions. Food Hydrocolloids, 20: 586–595.
[23] Lazaridou, A., Biliaderis, C.G. (2009). Concurrent phase separation and gelation in mixed oat β-glucans/sodium caseinate and oat β-glucans/pullulan dispersions. Food Hydrocolloids, 23: 886–895.
[24] Perrechil, F.A., Braga, A.L.M., Cunha, R.L. (2009). Interactions between sodium caseinate and LBG in acidified systems: Rheology and phase behavior. Food Hydrocolloids, 23: 2085–2093.
[25] Zhang, G., Foegeding, E.A. (2003). Heat-induced phase behavior of β-lactoglobulin/polysaccharide mixtures. Food Hydrocolloids, 17: 785–792.
[26] Xia, J., Dubin, P.L. (1995). Protein–polyelectrolyte complexes. In Macromolecular complexes in chemistry and biology (eds P.L. Dubin, J. Bock, R. Davies, D. N. Schulz, C. Thies), Berlin: Springer-Verlag, pp. 247–274.
[27] Zaitzev, V.S., Izumrudov, V.A., Zezin, A.B. (1992). A new family of water-soluble protein–polysaccharide complexes. Polymer Science USSR, 34 (1): 54–55.
protein/gum arabic coacervates. Journal of Rheology, 48(6): 1215-1228.
[17] Kasapis, S. (2008). Phase separation in biopolymer gels: a low- to high-solid exploration of structural morphology and functionality. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 48: 341–359.
[18] Tolstoguzov, V.B. (2003). Some thermodynamic considerations in food formulation. Food Hydrocolloids, 17: 1–23.
[19] Kontogiorgos, V., Tosh, S.M., Wood, P.J. (2009). Phase behaviour of high molecular weight oat β-glucan/whey protein isolate binary mixtures. Food Hydrocoilloids, 23: 949–956.
[20] Antonov, A.Y., Dmitrochenko, A.P., Leontiev, A.L. (2006). Interactions and compatibility of 11S globulin from Vicia faba seeds and sodium salt of carboxymethylcellulose in an aqueous medium. International Journal of Biological Macromolecules, 38: 18–24.
[21] Ercelebi, E.-A., Ibanoglu, E. (2007). Influence of hydrocolloids on phase separation and emulsion properties of whey protein isolate. Journal of Food Engineering, 80: 454–459.

Optimizing complex formation of Persian gum-Whey protein isolate

Raoufi, N. [1*], Kadkhodaee, R. [2], Najaf Najafi, M. [3]

1. PhD of Food Science and Technology, Department of Food Nanotechnology, Research Institute of Food Science and Technology (RIFST), Mashhad, Iran
2. Associate Prof., Department of Food Nanotechnology, Research Institute of Food Science and Technology (RIFST), Mashhad, Iran
3. Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and education Center, AREEO, Mashhad, Iran

(Received: 2016/01/25 Accepted: 2016/02/29)

Persian gum is an anionic polysaccharide, exudes from mountain almond tree. Unfortunately, there is no information about its interaction with unfolded proteins. The objectives of the current study are investigation of heating time on the properties of WPI and the complexes thereof. In this regard, first the effect of thermal processing (at 80°C, for 0-35 min) on the turbidity of whey protein isolate was surveyed at pH 4.0. The electrostatic interaction between treated WPI and Persian gum was also surveyed as a function of heating time and mixing ratios (2:1, 1:1, 1:2, 1:5, 1:10 and 1:20). Results indicated the significant increasing in the turbidity of treated WPI solutions (mainly after 25 min) with a high inconsistency leading to the precipitation due to the protein-protein interactions at low pH and formation of large aggregates. Addition of Persian gum (PG) caused the formation of WPI-PG complexes and meaningful increasing in the stability of the mixture solutions. Furthermore, the rheological measurements (0-100 S^{-1}) showed that the mixture solution has pseudoplastic behavior with a large hysteresis loop and higher viscosity rather than the blank solutions, indicating the formation of protein-polysaccharide complexes. By calculation of protein and polysaccharide in the supernatant and precipitation phases, the most biopolymer concentration in the precipitation phase was demonstrated for the 35-min-treated WPI. On the other hand, the amount of polysaccharide was increased in the precipitation as WPI:PG mixing ratio decreased.

Keywords: *Amygdalus scoparia, Whey protein isolate, Turbidity, complex, viscosity*

* Corresponding Author E-Mail Address: nsm_rf@yahoo.com