



فعالیت سطحی و بین سطحی کانزوگه ایزوله پروتئین آب پنیر-صمغ ژلان بعنوان تابعی از درجه پلیمریزاسیون

مجید نوش کام^۱، مهدی وریدی^{۲*}

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

۲- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

اطلاعات مقاله	چکیده
تاریخ های مقاله :	این مطالعه با هدف تعیین تأثیر درجه پلیمریزاسیون واکنش مایلارد بر ویژگی های عملکردی ایزوله پروتئین آب پنیر صورت پذیرفت. کانزوگه ایزوله پروتئین آب پنیر-صمغ ژلان از طریق واکنش مایلارد تولید و نسبت جذبی محصولات حدواسط به نهایی (A_{294nm}/A_{420nm})، که بعنوان شاخص درجه پلیمریزاسیون واکنش مایلارد در نظر گرفته می شود، بررسی شد. کانزوگه های ایزوله پروتئین آب پنیر-صمغ ژلان سپس با استفاده از روش خوشه بندی K -means به سه خوشه درجه پلیمریزاسیون پایین، متوسط و بالا تقسیم بندی و فعالیت بین سطحی (قابلیت کاهش کشش بین سطحی، فعالیت امولسیفایری و پایداری امولسیون) و سطحی (ظرفیت کف کنندگی و پایداری کف) آن ها بررسی گردید. کشش بین سطحی بین دو فاز روغن و آب بطور مؤثرتری توسط کانزوگه ایزوله پروتئین آب پنیر-صمغ ژلان با درجه پلیمریزاسیون متوسط کاهش یافت که بیانگر سرعت جذب بالاتر این کانزوگه به فضای بین سطحی (فعالیت امولسیفایری بیشتر)، تشکیل لایه ضخیم ویسکوالاستیک در فضای بین سطحی و متعاقباً افزایش پایداری امولسیون از طریق دافعه استری می باشد. اگرچه ظرفیت کف کنندگی بطور معنی داری تحت تأثیر درجه پلیمریزاسیون قرار نگرفت ($p>0.05$)، اما پایداری کف در حضور کانزوگه ی با درجه پلیمریزاسیون متوسط بطور معنی داری بالاتر از کف پایدار شده با سایر کانزوگه ها بود ($p<0.05$). بنابراین درجه پلیمریزاسیون متوسطی جهت بهبود ویژگی های عملکردی پروتئین آب پنیر به منظور افزایش کاربرد صنعتی آن مورد نیاز است.
تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/۰۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۰۶	
کلمات کلیدی: واکنش مایلارد، درجه پلیمریزاسیون، پروتئین آب پنیر، ژلان، ویژگی عملکردی.	
DOI: 10.52547/fsct.18.09.02	
* مسئول مکاتبات: m.varidi@um.ac.ir	

۱- مقدمه

پروتئین‌ها یکی از مهم‌ترین و ضروری‌ترین اجزای رژیم غذایی جهت تأمین مقادیر کافی اسیدهای آمینه مورد نیاز انسان و حیوانات می‌باشند. صرف نظر از ارزش تغذیه‌ای، پروتئین‌های غذایی دارای ویژگی‌های عملکردی ویژه‌ای هستند که رفتار آن‌ها را در سامانه‌های غذایی طی تهیه، فراوری، ذخیره سازی و مصرف کردن تحت تأثیر قرار می‌دهد. علاوه بر این، پروتئین‌ها در کیفیت و ویژگی‌های حسی سامانه‌های غذایی شرکت کرده و از ویژگی‌های عملکردی مهم آن‌ها می‌توان به حلالیت، ظرفیت نگهداری آب، ویژگی کف کنندگی، ظرفیت ژل کنندگی و ویژگی‌های امولسیون کنندگی و جذب روغن اشاره نمود [۱-۳].

آب‌پنیر محصول جانبی فرایند تولید پنیر است که حاوی ترکیبات باقیمانده محلول در آب بعد از حذف بخش کازئینی می‌باشد. پروتئین‌های آب‌پنیر بدلیل در دسترس بودن، ویژگی‌های ساختاری و کاربردهای متنوع، اهمیت ویژه‌ای در صنایع غذایی و دارویی پیدا کرده است. با اینحال، حساسیت این پروتئین‌ها به دماهای بالا، شرایط اسیدی و قدرت یونی ممکن است کاربرد صنعتی آن‌ها را محدود کند [۴]. در حقیقت، ویژگی‌های عملکردی متنوع پروتئین تحت تأثیر عوامل درونی (ساختار مولکولی و ترتیب اجزای تشکیل دهنده) و خارجی (دما، pH و عوامل شیمیایی و محیطی) قرار می‌گیرد و ویژگی‌های عملکردی پروتئین‌های غذایی به آسانی با تغییر این عوامل تغییر می‌یابد. بطور کلی، پروتئین طی فراوری مواد غذایی در معرض عوامل خارجی قرار گرفته و ویژگی‌های عملکردی خود را بطور معنی‌داری از دست می‌دهد [۱].

در سال‌های اخیر، توجه ویژه‌ای به واکنش مایلارد بعنوان روشی سریع، خنثی و غیر سمی جهت تبدیل پروتئین به شکل پایدار آن و همچنین بهبود عملکرد تکنولوژیکی آن از قبیل فعالیت امولسیفایری، ظرفیت کف کنندگی، حلالیت و پایداری حرارتی شده است [۵-۷]. کانژوگه‌های ساکارید-پروتئین همچنین دارای ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی، پری‌بیوتیکی، آنتی‌بیوتیکی و ضد فشارخون می‌باشند [۸]. کانژوگه کردن پروتئین با پلی‌ساکاریدها سبب تولید ترکیباتی با فعالیت سطحی و بین سطحی بهبود یافته می‌گردد. در حقیقت، واکنش مایلارد از طریق افزایش حلالیت، تحرک در

فاز آبی و تغییرات کنفورماسیونی (دنا توره کردن جزئی و افزایش گروه‌های آبگریز در سطح) پروتئین سبب تولید ساختارهای انعطاف‌پذیر با سرعت مهاجرت و جذب سریع به فضای بین سطحی آب-روغن (در سامانه‌های امولسیون) و فضای سطحی آب-هوا (در سامانه‌های بر پایه کف) می‌شود. لازم به ذکر است که بهبود ویژگی‌های عملکردی پروتئین با استفاده از واکنش مایلارد وابسته به درجه پلیمریزاسیون بین پروتئین و پلی‌ساکارید بوده و درجه مشخصی از پلیمریزاسیون برای تولید کانژوگه‌هایی با ویژگی‌های عملکردی مناسب مورد نیاز است [۵]. شی و همکاران [۶] گزارش کردند که کانژوگه کردن ایزوله پروتئین آب‌پنیر با دکستران سبب بهبود فعالیت امولسیفایری آن می‌گردد و کانژوگه پروتئین-دکستران قابلیت تشکیل لایه بین سطحی ضخیم و متعاقباً پایدار کردن امولسیون روغن در آب را دارا می‌باشد. در مطالعه‌ای دیگر مشخص شد که افزایش زمان حرارت‌دهی ابتدا سبب افزایش فعالیت امولسیفایری کانژوگه ایزوله پروتئین آب‌پنیر-صمغ بذر کتان و سپس کاهش آن گردید که این حالت به توسعه پلیمریزاسیون نسبت داده شد که سبب کاهش تحرک مولکولی و سرعت مهاجرت کانژوگه به فضای بین سطحی می‌گردد [۷]. در این مطالعه، از صمغ ژلان کم آسیل^۱ جهت کانژوگه کردن پروتئین آب‌پنیر و بهبود ویژگی‌های سطحی و بین سطحی آن استفاده شده است.

صمغ ژلان پلی‌ساکاریدی خطی و خارج سلولی است که توسط باکتری *Sphingomonas elodea*^۲ تولید و از تکرار یک واحد چهارتایی متشکل از دو واحد گلوکز، گلوکورونیک اسید و رامنوز (نسبت مولی ۱:۱:۲) تشکیل شده است [۹]. ژلان رفتار رقیق شونده با برش در محلول‌های آبی رقیق دارد و نوع کم آسیل آن ویژگی‌های رهایش عطر و طعم بسیار خوبی از خود نشان می‌دهد. این صمغ به دلیل غیر سمی بودن، زیست تخریب‌پذیری و سازگاری زیستی بعنوان تغلیظ کننده، اتصال دهنده، تشکیل دهنده فیلم و پایدارکننده در انواع محصولات غذایی استفاده می‌شود [۱۰].

هدف از این مطالعه، بررسی درجه پلیمریزاسیون بر فعالیت سطحی و بین سطحی کانژوگه ایزوله پروتئین آب‌پنیر-صمغ ژلان بود. برای این منظور، ابتدا کانژوگه‌های مایلارد از نظر میزان پیشرفت درجه پلیمریزاسیون با همدیگر مقایسه و سپس

1. Low acyl gellan gum
2. *Sphingomonas elodea*

به سه خوشه با درجه پلیمریزاسیون بالا، متوسط و پایین تقسیم‌بندی و ویژگی‌های سطحی و بین‌سطحی این سه خوشه با همدیگر مقایسه گردید.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

صمغ ژلان کم آسیل (حاوی حداقل ۸۵ درصد ژلان) از شرکت آمستل^۱ هلند، ایزوله پروتئین آب‌پنیر^۲ (۹۰ درصد پروتئین) از شرکت لاکتوپرات^۳ آلمان و سدیم دی‌هیدروژن فسفات تک‌آبه، دی‌سدیم هیدروژن فسفات ۷ آبه، سدیم هیدروکسید، سدیم آزید و سدیم دودسیل سولفات از شرکت مرک آلمان خریداری شدند.

۲-۲- تهیه کانژوگه پروتئین آب‌پنیر-صمغ ژلان

جهت تهیه کانژوگه مایلارد، مخلوط ایزوله پروتئین آب‌پنیر و صمغ ژلان (با نسبت‌های ۱:۶، ۱:۳ و ۱:۲) در بافر فسفات سدیم (غلظت ۱۰ میلی مولار، pH برابر با ۷) و با کمک همزن مغناطیسی (۵۰۰ دور دقیقه بمدت ۳ ساعت) حل شد. از سدیم آزید با غلظت ۵۰ ppm جهت جلوگیری از رشد میکروبی طی نگهداری استفاده گردید. محلول بیوپلیمری در دمای ۴ درجه سلسیوس بمدت ۱۲ ساعت جهت آبوشانی پروتئین و پلی‌ساکارید نگهداری و در ادامه در دمای ۹۰ درجه سلسیوس بمدت ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه حرارت‌دهی و سپس تا رسیدن به دمای محیط خنک شد. کانژوگه‌های ایزوله پروتئین آب‌پنیر-صمغ ژلان سپس از نظر میزان پیشرفت درجه پلیمریزاسیون و فعالیت سطحی و بین‌سطحی مورد بررسی قرار گرفتند. لازم به ذکر است که کانژوگه‌های مایلارد تا زمان انجام آزمون در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند و تمامی آزمون‌ها روی کانژوگه‌های تازه تولید شده انجام گردید.

۲-۳- اندازه‌گیری درجه پلیمریزاسیون

میزان پیشرفت محصولات حدواسط و نهایی (ملانوئیدین) واکنش مایلارد به ترتیب با اندازه‌گیری جذب محلول کانژوگه در طول موج ۲۹۴ نانومتر (A_{294nm}) و ۴۲۰ نانومتر (A_{420nm})

پایش و سپس درجه پلیمریزاسیون کانژوگه‌های پروتئین-پلی‌ساکارید با استفاده از رابطه A_{294nm}/A_{420nm} بدست آمد. درجه پلیمریزاسیون شاخصی از تبدیل محصولات حدواسط واکنش مایلارد به محصولات نهایی است و مقدار پایین‌تر آن بیانگر تولید و تجمع بیشتر محصولات نهایی در سامانه کانژوگه پروتئین-پلی‌ساکارید می‌باشد [۱۱].

۲-۴- خوشه‌بندی کانژوگه‌های ایزوله پروتئین آب‌پنیر-صمغ ژلان بر اساس درجه پلیمریزاسیون

بعد از بررسی میزان پیشرفت درجه پلیمریزاسیون کانژوگه‌های ایزوله پروتئین آب‌پنیر-صمغ ژلان، از روش خوشه‌بندی K -means جهت خوشه‌بندی کانژوگه‌ها به سه خوشه درجه پلیمریزاسیون بالا، متوسط و پایین استفاده شد. روش خوشه‌بندی K -means بعنوان روشی پایه برای بسیاری از روش‌های خوشه‌بندی دیگر در نظر گرفته می‌شود. در این روش، هر خوشه متناظر با یک مرکز بوده و هر داده به خوشه‌ای با نزدیک‌ترین مرکز نسبت داده می‌شود. به این صورت که بعد از تعیین تعداد خوشه‌ها (K)، ابتدا K عضو بصورت تصادفی از میان n عضو بعنوان مراکز خوشه‌ها انتخاب می‌گردد. در مرحله بعد، $n-K$ عضو باقیمانده به نزدیک‌ترین خوشه تخصیص یافته و مراکز خوشه مجدداً بعد از تخصیص تمام اعضا محاسبه و با توجه به مراکز جدید به خوشه‌ها اختصاص پیدا می‌کنند. این کار تا زمانی ادامه می‌یابد که مراکز خوشه‌ها ثابت باقی بماند [۱۲].

۲-۵- بررسی فعالیت بین‌سطحی کانژوگه ایزوله پروتئین آب‌پنیر-صمغ ژلان

کشش بین‌سطحی، فعالیت امولسیفایری و پایداری امولسیون جهت بررسی فعالیت بین‌سطحی کانژوگه مایلارد مورد بررسی قرار گرفتند.

کشش بین‌سطحی فازهای آبی و روغن (روغن ذرت) در حضور کانژوگه مایلارد (با غلظت ۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر پروتئین) مطابق روش حلقه‌ی دونوی^۴ توسط تensiومتر (Kruss, Model K100, Germany) اندازه‌گیری و بصورت mN/m گزارش شد.

1. Amstel Products BV Co.

2. Whey protein isolate

3. Lactoprot Deutschland GmbH Co.

4. Du Nouy ring

۷-۲- آنالیز آماری

نتایج درجه پلیمریزاسیون بصورت طرح کاملاً تصادفی در قالب فاکتوریل با دو فاکتور نسبت پروتئین به صمغ ژلان (در ۳ سطح) و زمان حرارت دهی (در ۳ سطح) و بعد از خوشه بندی کانژوگه ها بر پایه درجه پلیمریزاسیون، نتایج در قالب طرح کاملاً تصادفی با یک فاکتور درجه پلیمریزاسیون (در ۳ سطح) توسط نرم افزار Minitab (نسخه ۱۶) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون توکی^۱ در سطح ۵ درصد صورت پذیرفت. خوشه بندی کانژوگه ها با استفاده از روش خوشه بندی K-means و با کمک نرم افزار SPSS (نسخه ۲۶) انجام شد. تمامی آزمایشات در سه نوبت تکرار شدند.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- درجه پلیمریزاسیون

درجه پلیمریزاسیون شاخص مناسبی جهت مطالعه میزان پیشرفت تبدیل محصولات حدواسط واکنش مایلارد به محصولات نهایی (ملانوئیدین) است و مقدار کمتر آن بیانگر تبدیل بیشتر محصولات حدواسط به نهایی می باشد [۱۶]. تغییرات درجه پلیمریزاسیون کانژوگه های ایزوله پروتئین آب پنیر-صمغ ژلان بعنوان تابعی از نسبت پروتئین به صمغ ژلان (WPI:GG) و زمان حرارت دهی در شکل ۱ نشان داده شده است. اثرات اصلی نسبت پروتئین به ژلان و زمان حرارت دهی بر درجه پلیمریزاسیون معنی دار بود ($p < 0.05$). بیشترین و کمترین درجه پلیمریزاسیون به ترتیب در کانژوگه های بدست آمده از نسبت پروتئین به ژلان برابر با ۱:۳ (WPI:GG; 3:1) و ۱:۶ (WPI:GG; 3:1) مشاهده شد. علاوه بر این، افزایش زمان حرارت دهی از ۳۰ دقیقه به ۶۰ دقیقه سبب افزایش معنی دار درجه پلیمریزاسیون و افزایش بیشتر زمان حرارت دهی منجر به کاهش معنی دار این شاخص شد؛ اگرچه درجه پلیمریزاسیون در کانژوگه های بدست آمده در ۹۰ دقیقه حرارت دهی بالاتر از انواع حاصل از حرارت دهی سامانه پروتئین-پلی ساکارید بمدت ۳۰ دقیقه بود.

فعالیت امولسیفایری و پایداری امولسیون کانژوگه ایزوله پروتئین آب پنیر-صمغ ژلان به ترتیب بر اساس روش آتوکی و همکاران [۱۳] و اینادا و همکاران [۱۴] با تغییرات مورد نیاز بررسی شد. محلول کانژوگه ی مایلارد (بر پایه ۶ میلی گرم در میلی لیتر پروتئین) با نسبت ۹۰ به ۱۰ با روغن ذرت (حجمی/حجمی) بمدت ۲ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور دقیقه توسط هوموژنایزر آزمایشگاهی (Ultra-Turrax T25; IKA-Labortechnik, Germany) هوموژن گردید. در ادامه، مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر از بخش پایینی امولسیون بلافاصله بعد از تولید و بعد از ۱۰ دقیقه نگهداری امولسیون در دمای محیط، توسط محلول سدیم دودسیل سولفات ۰/۱ درصد وزنی/حجمی رقیق شد (۵۰ برابر) و سپس جذب محلول در ۵۰۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (UV-2601, Rayleigh, China) ثبت شد. مقادیر جذب ثبت شده در زمان صفر (بلافاصله بعد از تولید) و بعد از ۱۰ دقیقه نگهداری به ترتیب بعنوان فعالیت امولسیفایری و پایداری امولسیون در نظر گرفته شدند.

۷-۲- بررسی فعالیت سطحی کانژوگه ایزوله

پروتئین آب پنیر-صمغ ژلان

ظرفیت کف کنندگی و پایداری کف کانژوگه ایزوله پروتئین آب پنیر-صمغ ژلان با استفاده از روش نوش کام و مددلو [۱۵] با کمی اصلاحات بررسی گردید. برای این منظور، کانژوگه مایلارد تا رسیدن به غلظت ۲ میلی گرم در میلی لیتر پروتئین توسط بافر سدیم فسفات (غلظت ۱۰ میلی مولار، pH برابر با ۷)، رقیق و سپس ۱۰ میلی لیتر از آن با استفاده از هوموژنایزر آزمایشگاهی (Ultra-Turrax T25; IKA-Labortechnik, Germany) در ۱۰۲۰۰ دور در دقیقه و بمدت ۱ دقیقه هوموژن گردید. ظرفیت کف کنندگی کانژوگه با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{ظرفیت کف کنندگی} \% = (A - B / B) \times 100$$

که در این فرمول، A و B به ترتیب بیانگر حجم کف بعد و قبل از هوموژن کردن می باشند.

پایداری کف نیز برحسب دقیقه و بصورت زمان مورد نیاز جهت کاهش ۵۰ درصد حجم کف گزارش گردید.

مراحل اولیه واکنش به منظور بهبود ویژگی‌های عملکردی پروتئین و جلوگیری از تولید محصولات پشرفته و قهوه‌ای رنگ ضروری بنظر می‌رسد [۵ و ۱۸]. در راستای نتایج این مطالعه، افزایش زمان حرارت‌دهی در سامانه کیتوزان-گلوکز (۴ ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس) سبب افزایش نسبت جذبی A_{294nm}/A_{420nm} شد که بیانگر کاهش درجه پلیمریزاسیون و محدود بودن واکنش مایلارد به تشکیل بیشتر ترکیبات حدواسط می‌باشد [۱۹]. افزایش درجه پلیمریزاسیون (A_{294nm}/A_{420nm} کمتر) در نتیجه واکنش مایلارد بین پروتئین آب‌پنیر و آرابینوز نیز در مطالعه‌ی پرسکو و همکاران [۲۰] گزارش شده است.

۳-۲- خوشه‌بندی کانژوگه‌های ایزوله پروتئین آب‌پنیر-صمغ ژلان بر اساس درجه پلیمریزاسیون

در این مطالعه، ۹ تیمار کانژوگه ایزوله پروتئین آب‌پنیر-صمغ ژلان به سه گروه مختلف درجه پلیمریزاسیون (بالا، متوسط و پایین) خوشه‌بندی و هر تیمار بر اساس فاصله آن با مرکز خوشه انتخاب شد (شکل ۲).

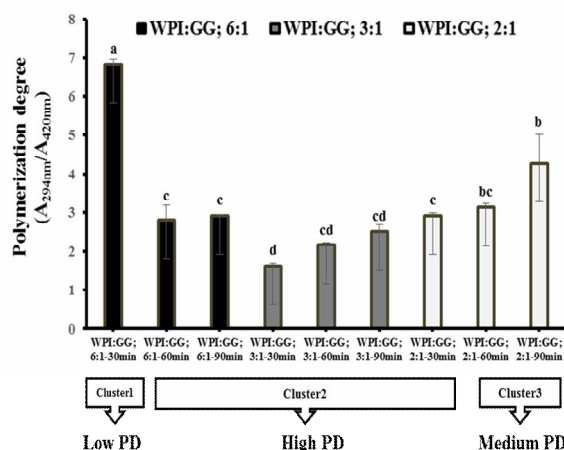


Fig 2 Classification of whey protein isolate-gellan gum (WPI:GG) conjugates into three low, medium, and high polymerization degree (PD) clusters.

همانطور که در شکل ۲ نشان داده شده است، تنها تیمار WPI:GG; 6:1-30min در خوشه اول قرار گرفت و بنابراین بعنوان تیمار با درجه پلیمریزاسیون پایین (Low PD) در نظر گرفته شد. شش تیمار WPI:GG; 6:1-60min، WPI:GG; 6:1-90min، WPI:GG; 3:1-30min، WPI:GG; 3:1-60min و WPI:GG; 3:1-90min در خوشه دوم قرار گرفتند و

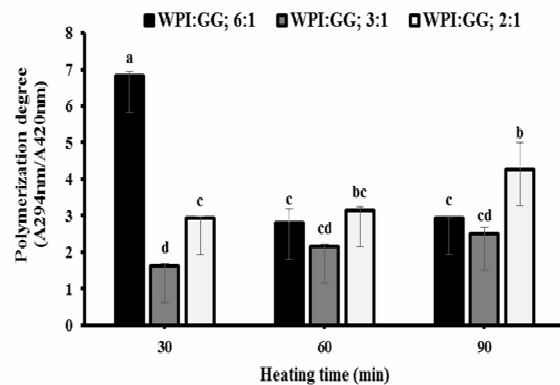


Fig 1 Polymerization degree (PD) of whey protein isolate-gellan gum conjugates as a function of protein:gellan ratio (WPI:GG) and heating time (min).

افزایش زمان حرارت‌دهی در سامانه پروتئین-ژلان حاوی غلظت پایین پلی‌ساکارید ژلان (WPI:GG; 6:1) سبب افزایش معنی‌دار درجه پلیمریزاسیون گردید. این حالت ممکن است ناشی از کانژوگه شدن پروتئین با گروه‌های کربونیل صمغ ژلان و متعاقباً تشکیل مقادیر بیشتری از محصولات حدواسط در ابتدای فرایند حرارتی باشد و افزایش زمان حرارت‌دهی احتمالاً منجر به تبدیل این ترکیبات به انواع پلیمری قهوه‌ای رنگ یا ملانوییدین در این سامانه شده است. به استثنای سامانه‌ی WPI:GG; 2:1 که درجه پلیمریزاسیون کانژوگه‌های بدست آمده از حرارت‌دهی سامانه بمدت ۹۰ دقیقه بطور معنی‌داری ($p < 0.05$) کمتر از کانژوگه‌های حاصل از ۳۰ دقیقه حرارت‌دهی بود، سامانه‌های پروتئین-ژلان حاوی غلظت‌های بالاتر صمغ ژلان (WPI:GG; 3:1 و WPI:GG; 2:1) ($p > 0.05$) دستخوش کاهش غیر معنی‌دار ($p > 0.05$) درجه پلیمریزاسیون با افزایش زمان حرارت‌دهی شدند. کاهش درجه پلیمریزاسیون در این سامانه‌ها ممکن است ناشی از افزایش ویسکوزیته محلول پروتئین-پلی‌ساکارید با افزایش غلظت صمغ ژلان باشد. علاوه بر این، حرارت‌دهی بر پایه واکنش مایلارد سامانه‌های پروتئین-پلی‌ساکارید، بدلیل تشکیل ترکیبات با وزن مولکولی بالا، سبب افزایش ویسکوزیته آن‌ها می‌شود [۱۵ و ۱۷]. در این حالت، افزایش ویسکوزیته سامانه سبب جلوگیری از پیشرفت واکنش مایلارد به سمت محصولات قهوه‌ای رنگ نهایی و محدود کردن واکنش به تولید بیشتر محصولات حدواسط با افزایش زمان حرارت‌دهی می‌گردد. بنابراین، کنترل واکنش مایلارد و متوقف کردن آن در

تیماری که کمترین فاصله را با مرکز خوشه داشت (WPI:GG; 3:1-90min)، بعنوان تیمار با بالاترین درجه پلیمریزاسیون (High PD) انتخاب شد. دو تیمار WPI:GG; 2:1-30min و WPI:GG; 2:1-60min خوشه سوم قرار گرفتند و تیمار WPI:GG; 2:1-90min که اختلاف معنی داری از نظر درجه پلیمریزاسیون با سایر تیمارها نشان داد، بعنوان تیمار با درجه پلیمریزاسیون متوسط (Medium PD) در نظر گرفته شد. این روش تقسیم بندی منجر به انتخاب تیمارهایی با حداکثر اختلاف می شود و بنابراین اثر هر تیمار بر ویژگی های سطحی و بین سطحی کانژوگه پروتئین-پلی ساکارید بسادگی قابل بررسی خواهد بود.

۳-۳- کشش بین سطحی

واکنش مایلارد از طریق تغییرات کنفورماسیونی، دناتوره کردن جزئی و افزایش گروه های آبریز در سطح پروتئین سبب تولید کانژوگه های پروتئین-پلی ساکارید با ساختار انعطاف پذیری می گردد که سرعت مهاجرت و جذب آن ها به فضای بین سطحی آب-روغن و آب-هوا بیشتر از پروتئین اصلاح نشده می باشد [۵]. کشش بین سطحی بین دو فاز آب و روغن در حضور کانژوگه ایزوله پروتئین آب پنیر-صمغ ژلان با درجات پلیمریزاسیون پایین، متوسط و بالا در شکل ۳ نشان داده شده است. کشش بین سطحی بطور معنی داری ($p < 0.05$) توسط کانژوگه های با درجه پلیمریزاسیون متوسط و بالا کاهش یافت و این اثر در حضور کانژوگه با درجه پلیمریزاسیون متوسط بیشتر مشهود بود.

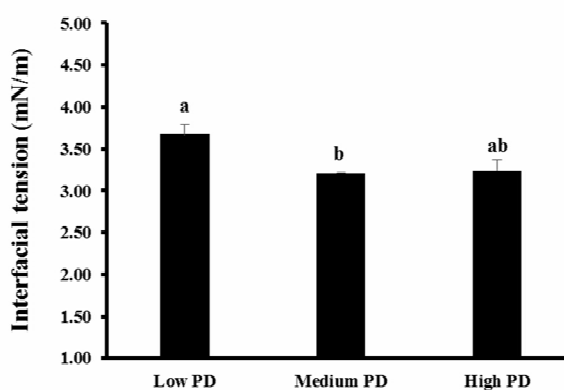


Fig 3 Interfacial tension (mN/m) at oil/water interface in the presence of low, medium, and high PD whey protein isolate-gellan gum conjugates.

همانطور که اشاره شد، دناتوره شدن و باز شدن جزئی ساختار پروتئین در اثر واکنش مایلارد سبب در معرض قرار گرفتن

گروه های آبریز در سطح پروتئین [۲۱] و متعاقباً افزایش احتمال برهمکنش بین این گروه های آبریز با قطرات آبریز روغن می شود [۲۲]. این حالت سبب کاهش سریع کشش بین سطحی در فضای بین سطحی روغن/آب شده و بخش پلی ساکاریدی کانژوگه نیز از طریق دافعه استری بین قطرات به پایداری بیشتر سامانه امولسیون کمک می کند [۲۳]. لازم به ذکر است که مراحل پیشرفته واکنش مایلارد (درجه پلیمریزاسیون بالا) ممکن است به تولید ترکیبات پلیمری تیره رنگ و با حلالیت کم منجر شود؛ در این حالت ویژگی های عملکردی پروتئین، که مستقیماً وابسته به حلالیت آن می باشند، بطور معنی داری تحت تأثیر قرار می گیرند [۲۲ و ۲۴]. در نتیجه، کاهش فعالیت بین سطحی کانژوگه مایلارد با درجه پلیمریزاسیون بالا در مقایسه با نوع با درجه پلیمریزاسیون متوسط می تواند ناشی از اتصالات عرضی پیچیده در مراحل نهایی واکنش مایلارد باشد که سبب کاهش حلالیت و متعاقباً کاهش فعالیت بین سطحی آن شده است؛ اگرچه این کاهش فعالیت بین سطحی معنی دار نبود.

۳-۴- فعالیت امولسیفایری و پایداری امولسیون

فرایند کانژوگاسیون بعنوان روشی آسان و سریع جهت بهبود ویژگی های امولسیفایری پروتئین های غذایی شناخته شده است. در این حالت، جزء پروتئینی از طریق برهمکنش های آبریز به سطوح قطرات روغن متصل شده و جزء پلی ساکاریدی از طریق ایجاد دافعه استری و الکترواستاتیکی قوی بین قطرات روغن سبب پایداری سامانه امولسیونی می شود [۱۸ و ۲۵]. فعالیت امولسیفایری کانژوگه ایزوله پروتئین آب پنیر-صمغ ژلان با درجه پلیمریزاسیون متوسط بطور معنی داری ($p < 0.05$) بالاتر از سایر کانژوگه ها بود که احتمالاً ناشی از فعالیت بین سطحی و متعاقباً سرعت بالای جذب آن به فضای بین سطحی روغن/آب می باشد (شکل ۴- A). امولسیون حاوی کانژوگه ایزوله پروتئین آب پنیر-صمغ ژلان با درجه پلیمریزاسیون متوسط نیز پایداری بالاتری ($p < 0.05$) نسبت به سایر نمونه های امولسیون نشان داد (شکل ۴- B)؛ این حالت به قرار گرفتن سریع تر کانژوگه در فضای بین سطحی، تشکیل لایه ضخیم و ویسکوالاستیک در سطح قطرات و در نتیجه ایجاد دافعه استری و الکترواستاتیک قوی بین قطرات و کاهش بهم پیوستگی آن ها نسبت داده می شود [۵]. علاوه بر این، غلظت صمغ ژلان در این کانژوگه

در مراحل پیشرفته واکنش ممکن است سبب تشکیل اتصالات عرضی درون- و برون- مولکولی متعدد و در نتیجه کاهش حلالیت پروتئین‌های غذایی گردد [۲۹]. بنابراین، ایجاد ساختارهای متراکم و پیشرفته در کنار حلالیت پایین پروتئین در مراحل نهایی واکنش مایلارد می‌تواند به کاهش فعالیت امولسیفایری و پایداری امولسیون کانژوگه‌های پروتئین- پلی‌ساکارید با درجه پلیمریزاسیون بالا منجر شود. قابلیت ضعیف کانژوگه ایزوله پروتئین آب‌پنیر-صمغ ژلان با درجه پلیمریزاسیون پایین در تشکیل و پایداری کردن امولسیون احتمالاً به تعداد بسیار پایین پیوند کووالانسی بین پروتئین و پلی‌ساکارید نسبت داده می‌شود که جهت بهبود ویژگی‌های عملکردی آن ناکافی بوده است.

۳-۵- ظرفیت کف‌کنندگی و پایداری کف

تغییر در ساختار یا کنفورماسیون پروتئین بعد از گلائیکه شدن با پلی‌ساکارید، معمولاً سبب افزایش حلالیت، تحرک، انعطاف‌پذیری و سرعت جذب آن به فضای بین‌سطحی آب- هوا می‌شود [۱۲ و ۳۰]. با افزایش درجه پلیمریزاسیون، ظرفیت کف‌کنندگی کانژوگه‌های ایزوله پروتئین آب‌پنیر-صمغ ژلان بطور غیر معنی‌داری ($p > 0.05$) کاهش یافت (شکل ۵-۱) که به کاهش ورود مولکول‌های هوا، تشکیل حباب و جلوگیری از افزایش حجم کف در اثر ویسکوزیته بالای فاز پیوسته طی همزدن (هوموژن کردن) نسبت داده شده است [۳۱]؛ غلظت ژلان در کانژوگه‌های با درجه پلیمریزاسیون متوسط و بالا بمراتب بیشتر از نوع با درجه پلیمریزاسیون پایین بود که عمدتاً از طریق افزایش ویسکوزیته سبب جلوگیری از افزایش حجم کف سامانه شده است.

اگرچه اختلاف معنی‌داری بین ظرفیت کف‌کنندگی کانژوگه‌های ایزوله پروتئین آب‌پنیر-صمغ ژلان مشاهده نشد، اما کانژوگه‌ی با درجه پلیمریزاسیون متوسط قابلیت پایداری کف بالاتری ($p < 0.05$) نسبت به سایر نمونه‌های کانژوگه نشان داد (شکل ۵-۲). بطور کلی، کانژوگه‌های مایلارد با قابلیت افزایش ضخامت و الاستیسیته^۴ فیلم بین‌سطحی و همچنین ایجاد ساختارهای پروتئینی باز و متحرک، قادر به افزایش معنی‌دار پایداری کف خواهند بود [۵]. کانژوگه‌های پروتئین-پلی‌ساکارید قابلیت تشکیل لایه ویسکوالاستیک در سطح حباب را دارا بوده و بنابراین از شکستن فیلم بین‌سطحی

نیز بالاتر از سایر نمونه‌ها بود که می‌تواند از طریق افزایش ویسکوزیته و ایجاد ساختارهای شبکه‌مانند در فاز پیوسته به پایداری بیشتر سامانه امولسیونی منجر شود [۲۶]. لازم به ذکر است که گروه‌های آسیل ژلان دارای ماهیت آبگریز می‌باشند [۲۷] که این حالت ممکن است به افزایش سرعت مهاجرت ژلان به فضای بین‌سطحی و برهمکنش آن با قطرات روغن کمک کند و این اثر در غلظت‌های بالاتر ژلان بیشتر مشهود بود.

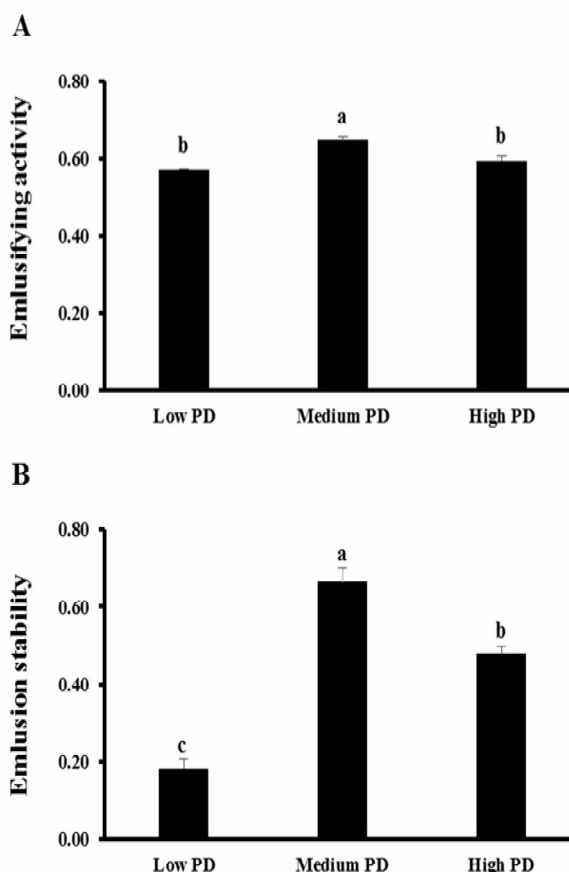


Fig 4 Emulsifying activity (A) and emulsion stability (B) of low, medium, and high PD whey protein isolate-gellan gum conjugates.

فعالیت امولسیفایری و پایداری امولسیون پایین کانژوگه مایلارد پروتئین آب‌پنیر-صمغ ژلان با درجه پلیمریزاسیون بالا ممکن است ناشی از ایجاد ساختارهای پلیمری متراکم و پیشرفته [۲۸] در اثر تبدیل بیش از حد ترکیبات حدواسط به نهایی باشد. علاوه بر این، گزارش شده است که واکنش اسیدهای آمینه (مانند لایزین) با بعضی از محصولات واکنش مایلارد از قبیل ۳-داکسی گلوکوزون^۱، گلیوکسال^۲ و متیل گلیوکسال^۳

1. 3-deoxyglucosone
2. glyoxal
3. methylglyoxal

4. Elasticity

۴- نتیجه گیری

این مطالعه نشان داد که درجه پلیمریزاسیون تأثیر بسزایی در ویژگی‌های عملکردی کانزوگه ایزوله پروتئین آب‌پنیر-صمغ ژلان دارد و درجه پلیمریزاسیون متوسطی جهت بهبود ویژگی‌های عملکردی پروتئین از طریق واکنش مایلارد مورد نیاز است. در این حالت، با کنترل دقیق شرایط واکنش از قبیل دما، زمان حرارت‌دهی، نوع پروتئین و پلی‌ساکارید، نسبت پروتئین به پلی‌ساکارید و pH محیط، می‌توان از پیشرفت واکنش مایلارد به سمت تولید ترکیبات پلیمری نهایی قهوه‌ای رنگ با ساختار نامشخص، فشرده و حلالیت کم جلوگیری و کانزوگه‌هایی با ویژگی‌های عملکردی بهبود یافته تولید نمود. کانزوگه پروتئین-پلی‌ساکارید تولیدی قابلیت استفاده بعنوان افزودنی غذازاد جهت بهبود ویژگی‌های عملکردی مواد غذایی را دارا می‌باشند.

۵- تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد بدلیل مساعدت‌های مالی در اجرای این مطالعه اعلام می‌دارند (کد طرح ۳/۴۸۱۴۷).

۶- منابع

- [1] Liu, J., Ru, Q., & Ding, Y. (2012). Glycation a promising method for food protein modification: Physicochemical properties and structure, a review. *Food Research International*, 49(1), 170-183.
- [2] Loveday, S. M. (2019). Food proteins: technological, nutritional, and sustainability attributes of traditional and emerging proteins. *Annual Review of Food Science and Technology*, 10, 311-339.
- [3] Aryee, A. N. A., Agyei, D., & Udenigwe, C. C. (2018). Impact of processing on the chemistry and functionality of food proteins. In *Proteins in food processing* (pp. 27-45). Woodhead Publishing.
- [4] Doost, A. S., Nasrabadi, M. N., Wu, J., A'yun, Q., & Van der Meeren, P. (2019). Maillard conjugation as an approach to improve whey proteins functionality: A review of conventional and novel preparation

بین حباب‌های مجاور جلوگیری می‌کنند [۳۱]. علاوه بر این، مساحت بین سطحی بیشتری توسط کانزوگه ایزوله پروتئین آب‌پنیر-صمغ ژلان پوشش داده شده و جزء پلی‌ساکاریدی کانزوگه نیز از طریق تشکیل شبکه‌ای خودآرا در فضای بین سطحی به استحکام فیلم بین سطحی و متعاقباً پایداری کف منجر می‌شود [۳۲].

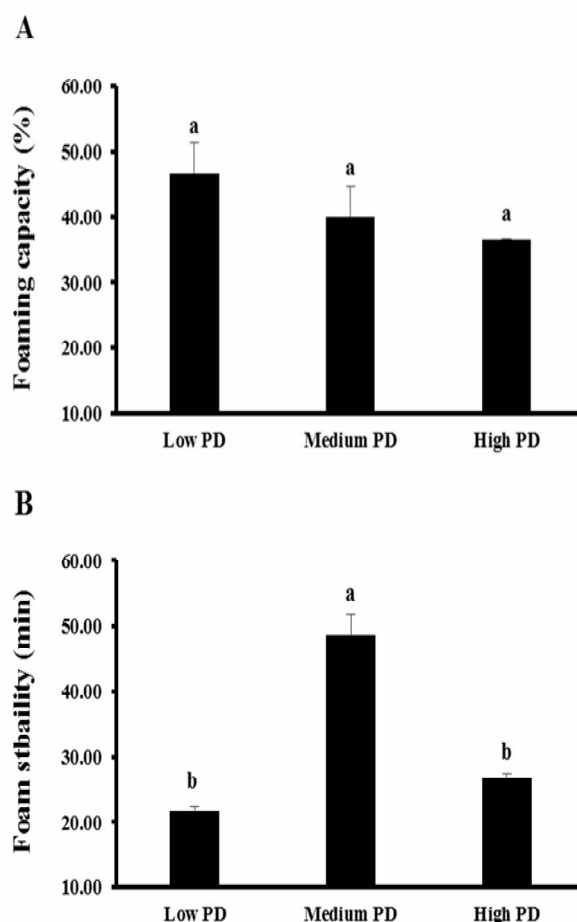


Fig 5 Foaming capacity (A) and foam stability (B) of low, medium, and high PD whey protein isolate-gellan gum conjugates.

در راستای نتایج این مطالعه، گزارش شده است که اگرچه اختلاف معنی‌داری از نظر ظرفیت کف کنندگی بین الوابومین، الوابومین حرارت دیده و کانزوگه‌های مایلارد پولولان- الوابومین مشاهده نشد، پایداری کف حاصل از کانزوگه‌های مایلارد بطور معنی‌داری بالاتر از سایر سامانه‌ها بود و این حالت به قابلیت کانزوگه الوابومین-پولولان در افزایش ویسکوزیته محلول، تشکیل لایه پلیمری حجیم در فضای بین سطحی و حفظ دافعه استری بین دو فضای بین سطحی مجاور نسبت داده شد [۳۳].

- Maillard reaction. *Food Research International*, 32(2), 129-133.
- [14] Inada, N., Hayashi, M., Yoshida, T., & Hattori, M. (2015). Functional improvements in β -lactoglobulin by conjugating with soybean soluble polysaccharide. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 79(1), 97-102.
- [15] Nooshkam, M., & Madadlou, A. (2016). Microwave-assisted isomerisation of lactose to lactulose and Maillard conjugation of lactulose and lactose with whey proteins and peptides. *Food Chemistry*, 200, 1-9.
- [16] Ajandouz, E. H., Tchiakpe, L. S., Ore, F. D., Benajiba, A., & Puigserver, A. (2001). Effects of pH on caramelization and Maillard reaction kinetics in fructose-lysine model systems. *Journal of Food Science*, 66(7), 926-931.
- [17] Martinez-Alvarenga, M. S., Martinez-Rodriguez, E. Y., Garcia-Amezquita, L. E., Olivas, G. I., Zamudio-Flores, P. B., Acosta-Muniz, C. H., & Sepulveda, D. R. (2014). Effect of Maillard reaction conditions on the degree of glycation and functional properties of whey protein isolate-Maltodextrin conjugates. *Food Hydrocolloids*, 38, 110-118.
- [18] Nooshkam, M., & Varidi, M. (2020). Maillard conjugate-based delivery systems for the encapsulation, protection, and controlled release of nutraceuticals and food bioactive ingredients: A review. *Food Hydrocolloids*, 100, 105389.
- [19] Tran, T. N., Doan, C. T., Nguyen, V. B., Nguyen, A. D., & Wang, S. L. (2019). Anti-Oxidant and Anti-Diabetes Potential of Water-Soluble Chitosan-Glucose Derivatives Produced by Maillard Reaction. *Polymers*, 11(10), 1714.
- [20] Perusko, M., Al-Hanish, A., Velickovic, T. C., & Stanic-Vucinic, D. (2015). Macromolecular crowding conditions enhance glycation and oxidation of whey proteins in ultrasound-induced Maillard reaction. *Food Chemistry*, 177, 248-257.
- [21] Joubran, Y., Moscovici, A., & Lesmes, U. (2015). Antioxidant activity of bovine alpha lactalbumin Maillard products and evaluation of their in vitro gastro-duodenal digestive proteolysis. *Food & Function*, 6(4), 1229-1240.
- [22] Amid, B. T., & Mirhosseini, H. (2014). Stabilization of water in oil in water (W/O/W) emulsion using whey protein techniques. *Trends in Food Science & Technology*, 91, 1-11.
- [5] Nooshkam, M., Varidi, M., & Verma, D. K. (2020). Functional and biological properties of Maillard conjugates and their potential application in medical and food: A review. *Food Research International*, 131, 109003.
- [6] Shi, Y., Liang, R., Chen, L., Liu, H., Goff, H. D., Ma, J., & Zhong, F. (2019). The antioxidant mechanism of Maillard reaction products in oil-in-water emulsion system. *Food Hydrocolloids*, 87, 582-592.
- [7] Dong, X., Du, S., Deng, Q., Tang, H., Yang, C., Wei, F., ... & Liu, L. (2019). Study on the antioxidant activity and emulsifying properties of flaxseed gum-whey protein isolate conjugates prepared by Maillard reaction. *International Journal of Biological Macromolecules*, 153, 1157-1164.
- [8] Wang, H. Y., Qian, H., & Yao, W. R. (2011). Melanoidins produced by the Maillard reaction: Structure and biological activity. *Food Chemistry*, 128(3), 573-584.
- [9] Hasheminya, S. M., Ebrahimzadeh-Mousavi, S. M. A., Ehsani, M. R., & Dehghannya, J. (2011). Effect of gellan hydrocolloid on rheological properties and stabilization of a fiber-enriched Doogh. *Journal of Food Research*, 21(2), 179-193.
- [10] Gupta, V. K., Treichel, H., Shapaval, V. O., de Oliveira, L. A., & Tuohy, M. G. (Eds.). (2017). *Microbial Functional Foods and Nutraceuticals*. John Wiley & Sons.
- [11] Cheng, K., Dong, W., Long, Y., Zhao, J., Hu, R., Zhang, Y., & Zhu, K. (2019). Evaluation of the impact of different drying methods on the phenolic compounds, antioxidant activity, and in vitro digestion of green coffee beans. *Food Science & Nutrition*, 7(3), 1084-1095.
- [12] Nasrollahzadeh, F., Varidi, M., Koocheki, A., & Hadizadeh, F. (2017). Effect of microwave and conventional heating on structural, functional and antioxidant properties of bovine serum albumin-maltodextrin conjugates through Maillard reaction. *Food Research International*, 100, 289-297.
- [13] Aoki, T., Hiidome, Y., Kitahata, K., Sugimoto, Y., Ibrahim, H. R., & Kato, Y. (1999). Improvement of heat stability and emulsifying activity of ovalbumin by conjugation with glucuronic acid through the

- properties of peanut protein isolate by conjugation with dextran through Maillard reaction. *Food Chemistry*, 131(3), 901-906.
- [29] Le, T. T., Holland, J. W., Bhandari, B., Alewood, P. F., & Deeth, H. C. (2013). Direct evidence for the role of Maillard reaction products in protein cross-linking in milk powder during storage. *International dairy Journal*, 31(2), 83-91.
- [30] Medrano, A., Abirached, C., Panizzolo, L., Moyna, P., & Añón, M. C. (2009). The effect of glycation on foam and structural properties of β -lactoglobulin. *Food Chemistry*, 113(1), 127-133.
- [31] Amid, B. T., Mirhosseini, H., Poorazarang, H., & Mortazavi, S. A. (2013). Implications of partial conjugation of whey protein isolate to durian seed gum through maillard reactions: foaming properties, water holding capacity and interfacial activity. *Molecules*, 18(12), 15110-15125.
- [32] Cai, B., & Ikeda, S. (2016). Effects of the conjugation of whey proteins with gellan polysaccharides on surfactant-induced competitive displacement from the air-water interface. *Journal of Dairy Science*, 99(8), 6026-6035.
- [33] Sheng, L., Tang, G., Wang, Q., Zou, J., Ma, M., & Huang, X. (2020). Molecular characteristics and foaming properties of ovalbumin-pullulan conjugates through the Maillard reaction. *Food Hydrocolloids*, 100, 105384.
- isolate-conjugated durian seed gum: Enhancement of interfacial activity through conjugation process. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 113, 107-114.
- [23] Temenouga, V., Charitidis, T., Avgidou, M., Karayannakidis, P. D., Dimopoulou, M., Kalogianni, E. P., ... & Ritzoulis, C. (2016). Novel emulsifiers as products from internal Maillard reactions in okra hydrocolloid mucilage. *Food Hydrocolloids*, 52, 972-981.
- [24] Ghribi, A. M., Gafsi, I. M., Blecker, C., Danthine, S., Attia, H., & Besbes, S. (2015). Effect of drying methods on physico-chemical and functional properties of chickpea protein concentrates. *Journal of Food Engineering*, 165, 179-188.
- [25] Wang, L. H., Sun, X., Huang, G. Q., & Xiao, J. X. (2018). Conjugation of soybean protein isolate with xylose/fructose through wet-heating Maillard reaction. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(4), 2718-2724.
- [26] Chiu, T. H., Chen, M. L., & Chang, H. C. (2009). Comparisons of emulsifying properties of Maillard reaction products conjugated by green, red seaweeds and various commercial proteins. *Food Hydrocolloids*, 23(8), 2270-2277.
- [27] Fasolin, L. H., Picone, C. S. F., Santana, R. C., & Cunha, R. L. (2013). Production of hybrid gels from polysorbate and gellan gum. *Food Research International*, 54(1), 501-507.
- [28] Liu, Y., Zhao, G., Zhao, M., Ren, J., & Yang, B. (2012). Improvement of functional



Surface and interfacial activity of whey protein isolate-gellan gum conjugate as a function of polymerization degree

Nooshkam, M.¹, Varidi, M.^{2*}

1. PhD student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
2. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

ARTICLE INFO

Article History:

Received 2020/ 02/ 24
Accepted 2020/ 04/ 25

Keywords:

Maillard reaction,
Polymerization degree,
Whey protein,
Gellan, Functional property.

DOI: 10.52547/fst.18.09.02

*Corresponding Author E-Mail:
m.varidi@um.ac.ir

ABSTRACT

This study was aimed to investigate the effect of Maillard reaction polymerization degree (PD) on functional properties of whey protein isolate. The whey protein isolate-gellan gum conjugate was synthesized by the Maillard reaction and the intermediate-to-final products absorption ratio ($A_{294\text{nm}}/A_{420\text{nm}}$), as the index of Maillard reaction PD, was evaluated. The whey protein isolate-gellan gum conjugates were then classified into three low, medium, and high PD using K-means clustering method, and their interfacial activity (interfacial tension reduction ability, emulsifying activity, and emulsion stability) and surface activity (foaming capacity and foam stability) were investigated. Interfacial tension at oil/water interface was reduced more efficiently by the medium PD whey protein isolate-gellan conjugate, indicating its higher adsorption rate to the interface (higher emulsifying activity), ability to form a viscoelastic thick layer at interface, and consequently increase the emulsion stability through steric repulsion. Although, foaming capacity was not significantly influenced by the PD ($p>0.05$), the foam stability in the presence of medium PD conjugate was significantly higher than the foams stabilized by other conjugates ($p<0.05$). Therefore, a medium PD is needed to improve the functional properties of whey protein and increase its industrial applications.