

Evaluation and comparison of functional properties of whey protein isolate-inulin mixtures and conjugates

Adeleh Mohammadi¹, Mohammad Ghorbani^{2*}, Alireza Sadeghi Mahoonak²,
Seyyed Mahdi Jafari²

¹PhD student, Faculty of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

²Faculty of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran,
Email: m.ghorbani@gau.ac.ir

Article Info

Article type:
Research Full Paper

Article history:
Received: 2021/10/18
Revised: 2021/11/18
Accepted: 2021/11/28

Keywords:
Whey Protein Isolate
Inulin
Maillard Reaction
Antioxidant Activity
Thermal stability

ABSTRACT

Background and objectives: Proteins are sensitive to environmental stresses, which limits their nutritional applications. Millard reaction leads to increase in the functional and biological properties of proteins. Whey protein isolate has a wide range of applications in the food industry, but is sensitive to certain environmental conditions and its functional properties are reduced. Inulin is a water-soluble polysaccharide widely used in the food and pharmaceutical industries. The aim of the present study was to prepare and compare the mixture and conjugate of whey protein isolate-inulin, with different weight ratios of protein-polysaccharide (1:1, 1:2, and 2:1) and investigate their functional properties.

Materials and methods: The preparation of whey protein isolate-inulin conjugate was done at 60 °C, relative humidity of 79% and pH=7 for 24 h. In this regard, polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) were performed to confirm the Maillard reaction, and also DPPH free radical scavenging activity, thermal stability (DSC), emulsifying activity index and emulsion stability index as well as viscosity evaluated for emulsions.

Results: The results of SDS-PAGE patterns and FT-IR validated the occurrence of the Maillard reaction between whey protein isolate and inulin. Also, the results indicated that the whey protein isolate and inulin conjugates have better functional properties than whey protein isolate and mixture of the whey protein isolate and inulin. Whey protein isolate -inulin conjugates at the ratio of 2:1 showed higher emulsifying activity index, emulsion stability index, antioxidant activity and thermal stability, whereas the emulsions formed by conjugated whey protein isolate -inulin at the ratio of 1:2 showed the highest viscosity.

Conclusion: The whey protein isolate-inulin conjugate improves the thermal stability, antioxidant activity, and emulsion stability of emulsion. The Maillard reaction is an effective process of improving the functional properties of proteins such as whey protein isolate for widespread use of them in food industry. The Maillard reaction conjugates of whey protein isolate and inulin could use in food formulations such as mayonnaise and salads dressing, dairy products and diet products.

Cite this article: Mohammadi, A., Ghorbani, M., Sadeghi Mahoonak, A.R., Jafari, S.M. 2022. Evaluation and comparison of functional properties of whey protein isolate-inulin mixtures and conjugates. *Food Processing and Preservation Journal*, 14 (2), 71-88.



© The Author(s).

DOI: 10.22069/EJFPP.2021.19599.1679

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

بررسی و مقایسه ویژگی‌های عملکردی مخلوط و کونژوگه ایزوله پروتئین آب پنیر - اینولین

عادل محمدی^۱، محمد قربانی^{۲*}، علیرضا صادقی ماهونک^۱، سیدمهدی جعفری^۲

^۱دانشجوی دکتری شیمی مواد غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
^۲دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران، رایانامه: m.ghorbani@gau.ac.ir

| اطلاعات مقاله | چکیده |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| نوع مقاله: مقاله کامل علمی-پژوهشی | سابقه و هدف: پروتئین‌ها نسبت به تنش‌های محیطی حساس هستند که این امر کاربردهای غذایی آنها را محدود می‌سازد. واکنش میلارد منجر به تغییرات ویژگی‌های عملکردی و بیولوژیکی پروتئین‌ها می‌شود. ایزوله پروتئین آب پنیر کاربردهای وسیعی در صنعت غذا دارد، اما نسبت به برخی شرایط محیطی حساس است و قابلیت‌های عملکردی آن کاهش می‌یابد. اینولین پلی ساکارید محلول در آب با کاربرد گسترده در صنایع غذایی و دارویی می‌باشد. پژوهش حاضر با هدف تهیه و مقایسه مخلوط و کونژوگه ایزوله پروتئین آب پنیر- اینولین با نسبت‌های وزنی مختلف پروتئین - پلی ساکارید (نسبت‌های ۱:۲، ۱:۱ و ۲:۱) و بررسی ویژگی‌های عملکردی آنها انجام گرفته است. |
| واژه‌های کلیدی: ایزوله پروتئین آب پنیر اینولین واکنش میلارد فعالیت آنتی‌اکسیدانی مقاومت حرارتی. | مواد و روش‌ها: تولید کونژوگه ایزوله پروتئین آب پنیر - اینولین در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۷۹ درصد و pH=۷ به مدت ۲۴ ساعت انجام شد. در همین راستا الکتروفورز ژل پلی‌آکریل‌آمید (SDS-PAGE)، طیف سنج مادون قرمز تبدیل فوریه (FT-IR) جهت تأیید واکنش میلارد انجام شد و همچنین فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH، مقاومت حرارتی نمونه‌ها (DSC)، فعالیت امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون و ویسکوزیته امولسیون‌ها ارزیابی شد. |
| | یافته‌ها: نتایج پروفایل الکتروفورز ژل پلی‌آکریل‌آمید و طیف سنج مادون قرمز تبدیل فوریه تأییدکننده وقوع واکنش میلارد بین ایزوله پروتئین آب پنیر و اینولین بود. همچنین نتایج مشخص ساخت کونژوگه‌های میلارد ویژگی‌های عملکردی بهتری نسبت به ایزوله پروتئین آب پنیر و مخلوط ایزوله پروتئین آب پنیر- اینولین دارند. کونژوگه ایزوله پروتئین آب پنیر - اینولین با نسبت ۲:۱ بالاترین فعالیت امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و مقاومت حرارتی را دارا بود، درحالی که امولسیون‌های تثبیت شده با نسبت ۱:۲ کونژوگه ایزوله پروتئین آب پنیر - اینولین بیشترین ویسکوزیته را نسبت به سایر امولسیون‌ها نشان داد. |
| | نتیجه‌گیری: کونژوگه ایزوله پروتئین آب پنیر - اینولین سبب بهبود مقاومت حرارتی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و پایداری امولسیون می‌گردند. واکنش میلارد یکی از روش‌های مناسب بهبود ویژگی‌های عملکردی پروتئین‌هایی مانند ایزوله پروتئین آب پنیر جهت کاربردهای گسترده‌تر در صنعت غذا می‌باشد. از کونژوگه‌های میلارد ایزوله پروتئین آب پنیر - اینولین می‌توان در فرمولاسیون‌های غذایی مانند سس مایونز و سالاد، فراورده‌های لبنی و محصولات رژیمی استفاده نمود. |

استناد: محمدی، ع.ه قربانی، م، صادقی ماهونک، ع.ر، جعفری، س.م. (۱۴۰۱). بررسی برخی خصوصیات فیزیکوشیمیایی و بقای باکتری‌های پروبیوتیک آبمیوه‌های سین بیوتیک صنعتی به روش سطح پاسخ و طرح آزمایشی دی اپتیمال با فاکتوریل ناقص. *فرآوری و نگهداری مواد غذایی*، ۱۴ (۲)، ۷۱-۸۸.

DOI: 10.22069/EJFPP.2021.19599.1679



© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

مقدمه

ایزوله پروتئین آب پنیر^۱ (WPI) یکی از محصولات جانبی صنایع شیر به ویژه صنعت پنیرسازی است. با توجه به محتوای پروتئینی بالا این ترکیب، به‌عنوان یک افزودنی غذایی کاربردهای فراوانی دارد (۱) و خواص ساختاری و فیزیکی شیمیایی مختلفی مانند ژله‌ای شدن، امولسیفایری، کف کردن و اتصال با ترکیبات طعم‌زا را ارائه می‌دهد که سبب ایجاد ظاهر، طعم، بافت و رفتار رئولوژیکی رضایت بخش در فرآورده‌های غذایی می‌گردد. با این حال، کاربرد صنعتی ایزوله پروتئین آب پنیر به دلیل کاهش حلالیت، کاهش ثبات امولسیفایری و کوآگوله شدن در شرایط خاص فرایند مانند قدرت یونی بالا، دما یا pH محدود است (۲). مطالعات انجام گرفته در سال‌های اخیر نشان داد که خصوصیات عملکردی ایزوله پروتئین آب پنیر توسط کونژوگه شدن با کربوهیدرات‌ها از طریق فرایند میلارد بهبود چشم‌گیری یافته است (۳). واکنش میلارد بین گروه‌های آمین آزاد پروتئین و گروه‌های کربونیل پلی ساکاریدها به وقوع می‌پیوندد. طی این فرایند باندهای کووالانسی بین پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌ها در شرایط کنترل شده از لحاظ زمان، حرارت و رطوبت نسبی ایجاد می‌گردد. کونژوگه‌های تولید شده در واکنش میلارد تلفیقی از خواص عملکردی پروتئین و کربوهیدرات‌ها را دارند و نسبت به شرایط محیطی حساسیت کمتری نشان می‌دهند (۳) و (۲). مشخص شده است که محصولات حاصل از واکنش میلارد دارای طیف وسیعی از ویژگی‌های عملکردی مناسب مانند فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی، حلالیت، امولسیفایری و مقاومت حرارتی می‌باشند (۴). دونگ و همکاران (۲۰۲۰) ویژگی‌های امولسیفایری و فعالیت آنتی‌اکسیدانی کونژوگه ایزوله پروتئین آب پنیر - صمغ دانه کتان را بررسی کردند.

این محققین گزارش دادند که گلیکاسیون منجر به بهبود فعالیت آنتی‌اکسیدانی و پایداری حرارتی ایزوله پروتئین آب پنیر - صمغ دانه کتان می‌گردد (۵). نوشکام و وریدی (۲۰۲۰) نیز گزارش دادند که گلیکاسیون ایزوله پروتئین آب پنیر با صمغ ژلان منجر به بهبود فعالیت سطحی، فعالیت امولسیفایری و ظرفیت کف سازی می‌گردد (۶). اینولین پلی ساکارید محلول در آب است و کاربرد گسترده‌ای در صنایع غذایی و دارویی دارد. درجه پلیمریزاسیون و میزان شاخه‌های جانبی، تاثیر بسزایی در تعیین عملکرد این پلی ساکارید دارند (۷). کاربرد اصلی اینولین به خواص تغذیه‌ای آن مرتبط می‌باشد که به‌عنوان فیبر رژیمی دارای فعالیت‌های پروبیوتیک بوده و همچنین خواص تکنولوژیکی آن شامل جایگزین چربی و شکر در فرآورده‌های غذایی کم کالری، ایجاد کننده ژل، امولسیفایری و قوام دهنده می‌باشد (۸). قصاب نژاد و همکاران (۲۰۱۹) گزارش دادند که افزودن اینولین به نوشیدنی کفیر سبب افزایش اسیدیته و ویسکوزیته محصول می‌گردد (۹). همچنین بیطرف و همکاران (۲۰۱۸) گزارش دادند که افزودن اینولین به ماست بر ویژگی‌های بافتی و فعالیت‌های پروبیوتیک محصول تاثیر گذار است (۱۰). با توجه به ویژگی‌های سودمند محصولات حاصل از واکنش میلارد، هدف از این پژوهش بررسی ویژگی‌های عملکردی مخلوط و کونژوگه ایزوله پروتئین آب پنیر و اینولین در نسبت‌های وزنی متفاوت (نسبت‌های ۱:۱، ۲:۱ و ۱:۲) و مقایسه آن‌ها می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد اولیه: اینولین از شرکت بنو (Beneo-Germany) و ایزوله پروتئین آب پنیر از شرکت جرمن پروت (GermanProt-Germany) خریداری شد. متانول،

آنالیز طیف سنجی، نمونه‌ها با برمید پتاسیم مخلوط و به صورت قرص آماده شدند. بررسی طیف حاصل از نمونه‌ها در محدوده عدد موج 4000 تا 400 cm^{-1} صورت پذیرفت (۱۲).

الکتروفورز SDS-PAGE: الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید تحت شرایط دناتورده با روش لاملی (۱۹۷۰) انجام گرفت. از ژل جداکننده ۱۵ درصد و ژل متراکم کننده ۵ درصد استفاده شد. الکتروفورز با ولتاژ ۵۰ ولت در ژل متراکم کننده به مدت ۳۰ دقیقه و با ولتاژ ۱۱۰ ولت در ژل جداکننده به مدت ۳ ساعت انجام شد. رنگ آمیزی ژل با کوماسی بریلیانت بلو انجام گرفت. جهت رنگبری ژل‌ها نیز از محلول رنگ‌بر (اسید استیک، متانول و آب مقطر) استفاده شد (۱۳).

ارزیابی فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH: فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH مخلوط و کنژوگه‌های ایزوله پروتئین آب پنیر- اینولین توسط روش نوشکام و مددلو (۲۰۱۶) با اندکی تغییرات انجام شد. برای این منظور، یک میلی‌لیتر از نمونه‌ها (۶ میکروگرم در میلی‌لیتر) با ۲ میلی‌لیتر از محلول متانولی DPPH (با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار) مخلوط و به شدت هم‌زده شد. لوله‌های آزمایش به مدت ۳۰ دقیقه در محل تاریک قرار گرفتند. بعد از این مدت میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. در نهایت درصد مهار رادیکال‌های DPPH با فرمول زیر محاسبه گردید، که در آن A_s جذب نمونه‌ها و محلول DPPH، A_b جذب متانول و محلول DPPH و A_c جذب متانول و نمونه می‌باشد (۱۴).

رابطه ۱.

$$\text{درصد مهار رادیکال آزاد} = [1 - (A_s - A_c) / A_b] \times 100$$

مقاومت حرارتی نمونه‌ها Differential scanning

calorimeter (DSC): رفتار حرارتی نمونه‌ها با استفاده از روش آنالیز گرماسنجی تفاضلی (DSC) (ZF-DSC-) (DSC) از روش آنالیز گرماسنجی تفاضلی (DSC) (ZF-DSC-) (DSC) بررسی گردید. ۱۰

معرف DPPH، پتاسیم برومید و سایر مواد شیمیایی از شرکت‌های مرک و سیگما آلدریچ تهیه گردید.

آماده‌سازی مخلوط پروتئین- پلی ساکارید: ایزوله پروتئین آب پنیر و اینولین (نسبت‌های ۱:۱، ۱:۲ و ۲:۱) در محلول بافر فسفات (pH=۷) حل و با استفاده از همزن مغناطیسی (PIT300-IRAN) در دمای اتاق به مدت ۲ ساعت مخلوط شدند. سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند تا جذب آب به‌طور کامل انجام شود. نمونه‌ها توسط خشک کن انجمادی (Operon -Korea) به پودر تبدیل گردید و پودرهای تولید شده تا زمان مصرف در ظروف کاملاً دربسته در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

آماده‌سازی کونژوگه پروتئین- پلی ساکارید در شرایط میلارد: ایزوله پروتئین آب پنیر و اینولین (۱:۱، ۱:۲ و ۲:۱) در محلول بافر (pH= ۷) حل گردید و با استفاده از همزن مغناطیسی در دمای اتاق به مدت ۲ ساعت مخلوط شدند. سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند تا جذب آب به‌طور کامل انجام شود. سپس نمونه‌ها توسط خشک کن انجمادی به پودر تبدیل شدند. پودرهای حاصل به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۷۹ درصد در آون قرار گرفتند تا واکنش میلارد بین پروتئین- پلی ساکارید انجام شود. برای تأمین رطوبت نسبی مورد نظر از محلول اشباع پتاسیم برومید و دسیکاتور استفاده شد (۱۱). پودرهای کونژوگه تا زمان مصرف در ظروف کاملاً دربسته در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جهت اطمینان از وقوع واکنش میلارد از روش الکتروفورز SDS-PAGE و FT-IR استفاده گردید.

طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR): تعیین پیشرفت کونژوگه شدن و بررسی ساختارها با کمک روش FTIR انجام شد. جهت آماده سازی برای

خطوط ۵-۷ کونژوگه‌های ایزوله پروتئین آب پنیر- اینولین با نسبت‌های وزنی متفاوت (۱:۲، ۱:۱ و ۱:۲) تولید شده در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و خط M نیز مارکر را مشخص می‌نماید. باندهای قابل مشاهده در محدوده‌ی ۱۴/۴، ۱۸ و ۷۰ کیلوالتون به ترتیب نشان دهنده‌ی پروتئین‌های آلفا- لاکتالبومین، بتا- لاکتوگلوبولین و سرم آلبومین در نمونه‌ی ایزوله پروتئین آب پنیر می‌باشد (۱۵). در حالت مخلوط ایزوله پروتئین آب پنیر - اینولین (خطوط ۲، ۳ و ۴) باندهای جدید تشکیل نشده و باندهای شاخص ایزوله پروتئین آب پنیر قابل مشاهده است که به معنای عدم وجود کمپلکس‌های الکترواستاتیک بین ایزوله پروتئین آب پنیر و اینولین است. چن و همکاران (۲۰۱۹) نیز مشابه این پدیده را در مورد مخلوط ایزوله پروتئین آب پنیر و صمغ آکاسیا گزارش دادند (۱۶). با اعمال دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و انجام شدن واکنش میلارد، باندهای پروتئینی تمایل به از بین رفتن دارند و اتصالات جدیدی تشکیل شده است (خطوط ۵، ۶ و ۷). تشکیل کونژوگه‌ها منجر به کاهش شدت باندها نسبت به پروتئین خالص می‌گردد و به جای آن نواری ظاهر می‌گردد که بیانگر ترکیبات با جرم مولکولی بالاتر است که نشان دهنده‌ی اتصال کووالانسی بین پروتئین و کربوهیدرات است (۱۷). با افزایش درجه حرارت انکوباسیون کونژوگه‌ها، درجه گلیکاسیون افزایش یافته و ترکیبات با وزن مولکولی بالا تشکیل می‌شوند. اشمیت و همکاران (۲۰۱۵) نیز این امر را در مورد کونژوگه‌های ایزوله پروتئین آب پنیر و پکتین گزارش دادند (۱۵). از لحاظ نسبت‌های متفاوت ایزوله پروتئین آب پنیر - اینولین تفاوتی بین الگوی باندها مشاهده نشد.

میلی‌گرم از نمونه‌ها در پن‌های آلومینیومی در دامنه حرارتی ۳۰ الی ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۰ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه حرارت دهی شدند.

رابطه ۲

$$\text{قدرت امولسیون کنندگی (m}^2/\text{g)} = \frac{A_0 \times 2 \times 2.303 \times DF}{c \times \phi \times \theta \times 10000}$$

رابطه ۳

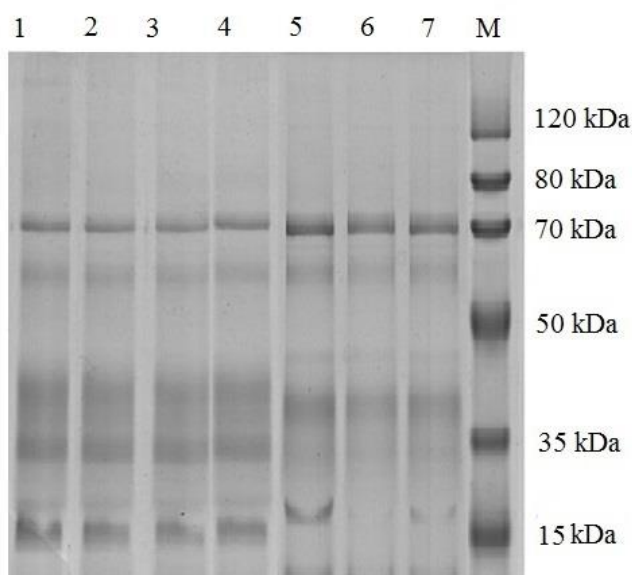
$$\text{پایداری امولسیون (دقیقه)} = \frac{A_0 \times 10}{A_0 - A_{10}}$$

ویسکوزیته: ویسکوزیته امولسیون‌های تولیدی توسط ویسکومتر چرخشی بروکفیلد (DV-II+ Pro, Brookfield, USA) در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد با استفاده از اسپیندل S00 انجام گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری: به منظور آنالیز داده‌ها و بررسی اطلاعات از طرح کاملاً تصادفی استفاده شد. جهت تعیین اختلاف میانگین داده‌ها پس از آنالیز واریانس‌ها با روش ANOVA، از آزمون چند دامنه دانکن در سطح معناداری ۵ درصد استفاده گردید. تجزیه و تحلیل آماری نتایج با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS 16 انجام شد. برای رسم گراف‌ها و نمودارها نیز از نرم افزار Excel استفاده گردید. تمامی آزمون‌ها در ۳ تکرار انجام شدند.

نتایج و بحث

پروفایل الکتروفورز SDS-PAGE: به منظور تایید و بررسی شکل‌گیری ترکیبات با وزن مولکولی بالا که بیانگر کونژوگه شدن ایزوله پروتئین آب پنیر و اینولین در حین فرایند میلارد می‌باشد، الکتروفورز SDS-PAGE انجام شده است. در واقع با این روش پیوندهای کووالانسی شکل گرفته بین ایزوله پروتئین آب پنیر و اینولین شناسایی می‌شوند. همان‌طور که در شکل ۱ مشخص است خط ۱ ایزوله پروتئین آب پنیر، خطوط ۲-۴ مخلوط ایزوله پروتئین آب پنیر- اینولین با نسبت‌های وزنی متفاوت (۱:۲، ۱:۱ و ۲:۱)،



شکل ۱- پروفایل الکتروفورز SDS-PAGE ایزوله پروتئین آب پنیر (خط ۱)، مخلوط ایزوله پروتئین آب پنیر - اینولین با نسبت‌های ۱:۱، ۲:۱ و ۱:۲ (خطوط ۲-۴)، کونژوگه ایزوله پروتئین آب پنیر - اینولین در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد با نسبت‌های ۱:۱، ۲:۱ و ۱:۲ (خطوط ۵-۷) و مارکر (M).

Figure 1- SDS-PAGE electrophoresis profile of WPI (line 1); WPI – Inulin mixture with ratio 1:1, 1:2 and 2:1 (lines 2-4); WPI – Inulin conjugate at 60°C with ratio 1:1, 1:2 and 2:1 (lines 5-7); marker (M).

مخلوط شدند (۱:۱۰۰ حجمی/حجمی). جذب نمونه‌ها در دقیقه صفر و ۱۰ دقیقه پس از تولید در طول موج ۵۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد و فعالیت امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون‌ها با استفاده از روابط ذیل بدست آمد. در این روابط A_{10} و A_0 جذب امولسیون رقیق شده در زمان صفر و ۱۰ دقیقه، DF فاکتور رقت، c غلظت اولیه نمونه (گرم/میلی لیتر)، ϕ مسیر نوری (۰/۰۱ متر) و θ مقدار روغن مورد استفاده برای تشکیل امولسیون است (۵).

طیف سنجی FT-IR: طیف سنجی FT-IR یک تکنیک سریع و کاربردی مفید برای مطالعه ساختار و برهم‌کنش‌های سیستم‌های پروتئین - پلی‌ساکاریدی است. زمانی که گروه‌های عاملی در سطح مولکولی

تعیین فعالیت امولسیون‌کنندگی^۱ و پایداری امولسیون^۲: به‌طور کلی ویژگی‌های امولسیون‌کنندگی نمونه‌ها توسط دو شاخص فعالیت امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون ارزیابی می‌شود. جهت تشکیل فاز آبی امولسیون، پودرهای تهیه شده در بافر فسفات (۰/۱ مولار، pH=۷) حل شدند. محلول‌های حاصل به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید تا جذب آب بصورت کامل صورت پذیرد. سپس روغن به محلول‌های کلئیدی اضافه شد و همگن سازی به مدت ۵ دقیقه توسط هموژنایزر (SilentCrusher M, Heidolph,) (۱۳۰۰۰ rpm) (Germany) انجام گرفت (۱۸). جهت تعیین فعالیت امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون‌ها، نمونه‌ها با محلول SDS (۰/۱ درصد وزنی/حجمی) رقیق و

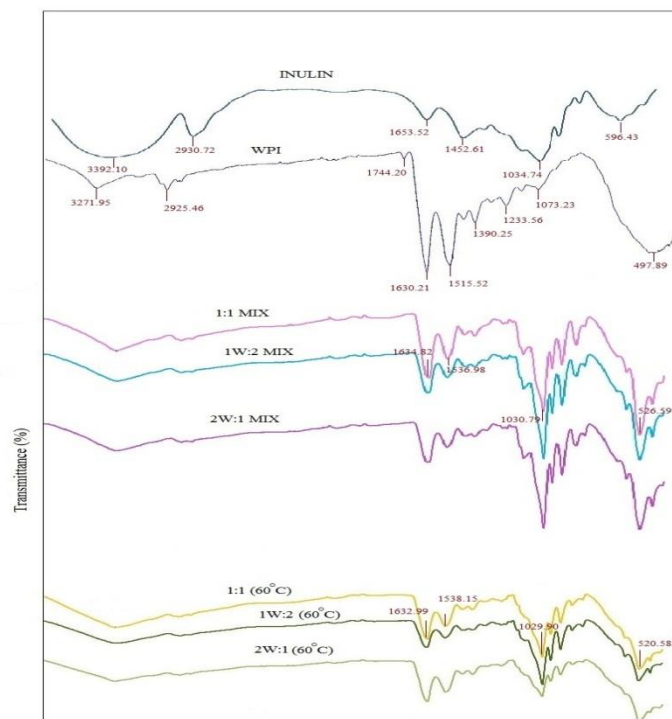
1. Emulsifying Activity Index
2. Emulsion Stability Index

نوع اول نیز تاثیرگذار است، حرارت باعث تغییرات در ساختار ثانویه پروتئین‌ها می‌شود و در نتیجه سبب تغییرات مکانی و شدت پیک‌ها می‌گردد (۲۴). شکل پیک موجود در عدد موجی ۱۶۳۰ که نمایانگر تجمع کامل پروتئین است از نظر ویژگی‌های ساختار ثانویه مهم است، به طوری که یک پیک صاف در ناحیه امید نوع اول به معنای ساختار ثانویه بی‌نظم‌تر می‌باشد (۲۲). پیک ۱۵۱۵ ایزوله پروتئین آب پنیر عمدتاً مرتبط با ارتعاشات خمشی N-H و به‌طور جزئی‌تر مرتبط با ارتعاشات کششی C=N باندهای پپتیدی است و به ناحیه امید نوع دوم معروف است (۲۵) و پیک مرتبط با امید نوع دوم بعد از مخلوط و کونژوگه شدن ایزوله پروتئین آب پنیر و اینولین به سمت عدد موجی بالاتر شیف‌ت می‌دهد. به‌طور کلی کونژوگه‌های تولید شده در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد در هر سه نسبت بیشترین عدد موجی را نشان دادند. این امر مشخص می‌نماید که ساختار صفحات بتای پروتئین کاهش یافته و ساختار پروتئین بیشتر کشیده می‌شود (۲۶). کاهش برخی از گروه‌های عملکردی مانند NH_2 ایزوله پروتئین آب پنیر و تشکیل گروه‌های جدید مانند ترکیبات آمادوری (C=O) باز شیف (C=N) و پیرازین‌ها (C=N) ممکن است طی فرایند میلارد انجام شود. ارتعاشات این گروه‌های جدید باندهای C=O، N-H و C-H گروه آمیدی در محدوده ۱۸۰۰-۸۰۰ جذب دارند (۱۴). همچنین پیک موجود در عدد موجی ۲۹۲۵ مربوط به کشش نامتقارن متیلن CH_2 ایزوله پروتئین آب پنیر است (۵ و ۲۵). اینولین نیز در عدد موجی ۲۹۳۰ پیکی را نشان داد که معرف پیوند کششی C-H در ساختار اینولین است (۲۷). بعد از مخلوط و کونژوگه شدن ایزوله پروتئین آب پنیر و اینولین موقعیت و شدت این دو باند بسیار کاهش یافت که این امر ممکن است به دلیل تعاملات بین مولکولی باشد که سبب می‌گردد ارتعاشات متیلن

واکنش می‌دهند تغییرات طیف FT-IR مانند ظهور باندهای جدید و تغییرات در شدت و مکان باندهای جذب قابل مشاهده است، که برای بررسی ویژگی‌های کونژوگه‌های واکنش میلارد این روش کارآمد می‌باشد (۱۹). شکل ۲ پروفایل طیف سنجی FT-IR نمونه‌ها را نشان می‌دهد. پیک موجود در طول موج ۱۰۳۴ اینولین را می‌توان به ارتعاشات کششی حلقه‌ترتراهیدروفوران فروکتوز C-O و ارتعاشات کششی C-C حلقه پیرانوز نسبت داد (۲۰ و ۲۱). بعد از مخلوط و کونژوگه شدن ایزوله پروتئین آب پنیر - اینولین شدت و فرکانس این پیک تغییر یافته است به طوری که به فرکانس‌های پایین‌تر منتقل شده و شدت آن نیز افزایش یافته است. پیک در طول موج ۱۶۳۰ ایزوله پروتئین آب پنیر نشانگر ناحیه امید نوع اول است که عمدتاً ناشی از ارتعاشات کششی پیوند C=O و به‌طور جزئی ارتعاشات کششی C=N و خمشی N-H می‌گردد (۱۱). این باند ماهیت پیوندهای هیدروژنی درگیر با گروه‌های C=O و N-H پیوندهای پپتیدی را مشخص می‌نماید (۳۴). نتایج نشان می‌دهد که با مخلوط و کونژوگه شدن ایزوله پروتئین آب پنیر و اینولین فرکانس این پیک تغییر یافته است و به فرکانس‌های بالاتر منتقل شده است. این تغییرات تاثیر واکنش میلارد را بر تعاملات بیوپلمری مشخص می‌سازد. منطقه امید نوع اول نسبت به تغییرات کنفورماسیونی ساختار ثانویه پروتئین‌ها که شامل باندهای هیدروژنی صفحات بتای پروتئین‌های تجمع یافته است حساس می‌باشد (۲۳) و عواملی مانند دما و تغییرات نسبت پروتئین به پلی‌ساکارید منجر به تغییرات فرکانس این پیوندها می‌گردد. به طوری که پیک نمونه‌های مخلوط و کونژوگه تولیدی با نسبت ۲ به ۱ ایزوله پروتئین آب پنیر به اینولین در فرکانس پائین‌تری قرار دارند. البته دما علاوه بر موقعیت بر شدت پیک‌های ناحیه امید

نیستند. این امر نشان دهنده تعاملات بین پروتئین و پلی ساکارید است و ظرفیت کمتر مولکول‌های کربوهیدرات برای ایجاد پیوندهای هیدروژنی بین مولکولی درون کربوهیدراتی در حضور پروتئین را مشخص می‌نماید. پیک موجود در عدد موجی ۱۳۹۰ مرتبط با آنیون کششی متقارن COO^- یا CH_3 در ساختار ایزوله پروتئین آب پنیر است (۱۱ و ۲۹). بعد از مخلوط و کونژوگ شدن ایزوله پروتئین آب پنیر و اینولین این پیک جابه جا شده و شدت آن نیز کاهش یافته است. شدت این کاهش در نسبت ۲:۱ اینولین- ایزوله پروتئین آب پنیر بیشتر است، در واقع با افزایش غلظت ایزوله پروتئین آب پنیر تشکیل باندهای هیدروژنی درون و بین مولکولی افزایش می‌یابد. تشکیل باندهای هیدروژنی فرکانس ارتعاشات کششی را کاهش می‌دهد به این جهت که نیروی بازتابی را کاهش می‌دهد (۳۰).

کاهش یابد. این نتایج با یافته‌های دونگ و همکاران (۲۰۲۰) مطابقت داشت که گزارش دادند که بعد از مخلوط و کونژوگ شدن صمغ بذر کتان و ایزوله پروتئین آب پنیر شدت این پیک کاهش یافته است (۵). پیک موجود در طول موج ۳۲۷۱ معرف ارتعاشات گروه هیدروکسیل آزاد و باندهای با گروه O-H و N-H ایزوله پروتئین آب پنیر است (۲۵ و ۱۱). این پیک بعد از مخلوط و کونژوگ شدن نمونه‌ها در محدوده طول موج ۳۲۷۰-۳۲۷۲ قرار گرفت و شدت آن بعد از واکنش میلارد افزایش یافته است. تشکیل پیوند هیدروژنی بین مولکولی با گروه کربونیل باندهای پتیدی در افزایش این پیک موثر است (۲۲). پیک‌های موجود در طول موج ۱۶۵۳ و ۳۳۹۲ به ترتیب نشان دهنده اسید کربوکسیلیک نامتقارن و گروه‌های هیدروکسیل (OH)- اینولین است (۲۷ و ۲۸). این پیک‌ها بعد از مخلوط و کونژوگ شدن ایزوله پروتئین آب پنیر و اینولین قابل شناسایی

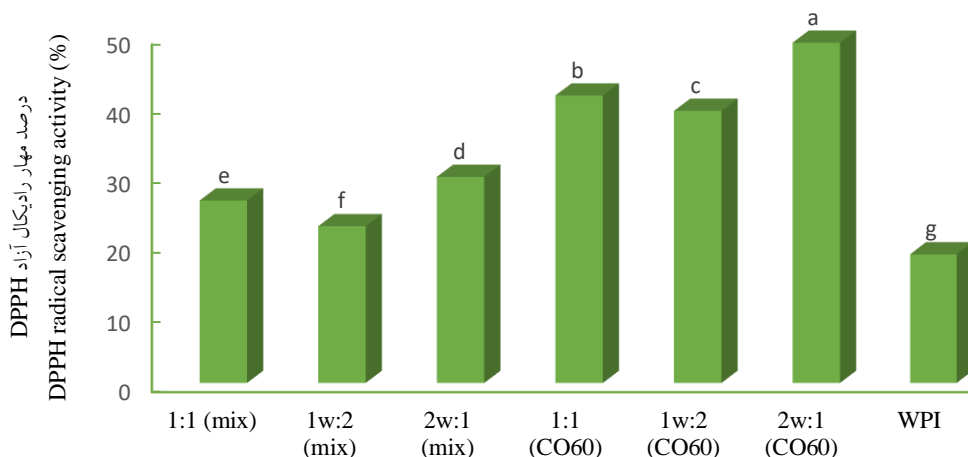


شکل ۲- طیف‌سنجی FT-IR ایزوله پروتئین آب پنیر، اینولین، مخلوط و کونژوگ‌های ایزوله پروتئین آب پنیر - اینولین (۶۰ درجه سانتی گراد).

Figure 2- FTIR spectra of Inulin, WPI and WPI-Inulin mixtures and conjugates (60 °C)

(۱۷). به‌طور کلی یک همبستگی مثبت بین درجه گلیکاسیون و مهار رادیکال آزاد DPPH وجود دارد (۳۲). محصولات واکنش میلارد توانایی بسیار خوبی در چلاته‌کنندگی فلزات، قدرت احیاکنندگی و مهار رادیکال آزاد دارند (۳۳ و ۳۴). نسبت ۲:۱ ایزوله پروتئین آب پنیر- اینولین در حالت مخلوط و کونژوگه بالاترین مهار رادیکال آزاد DPPH را نشان داد که این امر می‌تواند به این علت باشد که با افزایش نسبت ایزوله پروتئین آب پنیر، فعالیت آنتی‌اکسیدانی هیبرید پروتئین - پلی ساکارید جهت مهار رادیکال آزاد افزایش می‌یابد.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی: کونژوگه‌های پروتئین- پلی ساکارید میلارد می‌توانند با اهدای الکترون به رادیکال‌های DPPH به تشکیل مولکول پایدار کمک نمایند (۳۱). نتایج مهار رادیکال آزاد DPPH نمونه‌ها در شکل ۳ مشخص شده است. ایزوله پروتئین آب پنیر (۱۸/۴۶ درصد) و کونژوگه ایزوله پروتئین آب پنیر- اینولین (۲:۱) تولید شده در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد (۴۸/۹ درصد) به ترتیب کمترین و بیشترین قدرت مهار رادیکال آزاد را نشان دادند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی و مهار رادیکال‌های آزاد توسط ایزوله پروتئین آب پنیر عمدتاً به آمینواسیدهای تیروزین و تربیتوفان نسبت داده می‌شود.



شکل ۳- مهار رادیکال آزاد DPPH ایزوله پروتئین آب پنیر، مخلوط و کونژوگه ایزوله پروتئین آب پنیر - اینولین.

Figure 3- DPPH radical scavenging activity of WPI and WPI-Inulin mixtures and conjugates.

غیر کریستالی است. این شاخص را می‌توان در بیشتر ترکیبات غذایی آب دوست مانند مواد غذایی جامد بدون چربی مشاهده نمود. پروتئین‌ها به عنوان جامدات غذایی بدون چربی به اشکال غیر کریستالی وجود دارند (۳۵). دمای دناتوراسیون (T_d) برای توصیف پایداری حرارتی پروتئین و آنتالپی (ΔH) انرژی مورد نیاز جهت غلبه بر برهم کنش‌های غیر کووالانسی را در طی دناتوراسیون پروتئین اندازه‌گیری می‌نماید (۱۰) و با مقدار ساختارهای مرتب شده (منظم) پروتئین ارتباط دارد (۲). دمای

مقاومت حرارتی نمونه‌ها: ویژگی‌های ساختاری و عملکردی پروتئین‌ها می‌تواند تحت تاثیر فرایند حرارتی قرار گیرد که منجر به تغییر شکل ساختار طبیعی پروتئین‌ها در پی تخریب پیوندهای هیدروژنی، الکترواستاتیک، هیدروفوبیک و باندهای دی سولفیدی می‌گردد (۱۲). ویژگی‌های حرارتی حاصل از DSC نمونه‌های ایزوله پروتئین آب پنیر، مخلوط و کونژوگه ایزوله پروتئین آب پنیر- اینولین در جدول ۱ مشخص شده است. دمای انتقال شیشه‌ای (T_g) یکی از مهم‌ترین خصوصیات فیزیکوشیمیایی مواد جامد آمورف و

گلیکاسیون منجر به بهبود پایداری حرارتی کونژوگه‌ها و کاهش آنتالپی (ΔH) می‌گردد که مشخص کننده‌ی حالت متراکم و تجمع یافته‌ی پروتئین غذایی است (۱۲). فاکتورهای زیادی از جمله افزایش بازدارندگی استریک، تغییرات کنفورماسیونی و افزایش بارسطحی وجود دارد که احتمالاً سبب بهبود ثبات حرارتی پروتئین‌ها پس از گلیکاسیون با ساکاریدها می‌شود (۳۶). با افزایش اینولین به ایزوله پروتئین آب پنیر دمای انتقال شیشه‌ای کاهش و پس از گلیکاسیون نمونه‌ها در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد افزایش می‌یابد. عوامل بسیاری در افزایش و یا کاهش دمای انتقال شیشه‌ای پروتئین‌ها سهیم می‌باشند. افزودن پلاستی‌سایزرها، وجود گروه‌های اصلی انعطاف پذیر، عدم تقارن و گروه‌های غیرقطبی (گروه‌های هیدروفوبیک) منجر به کاهش دمای انتقال شیشه‌ای می‌گردد. همچنین وجود گروه‌های جانبی حجیم، گروه‌های سفت کننده (باقی مانده‌های پرولین و باندهای دوگانه جزئی C-N در زنجیره پلی پپتید اصلی)، تقارن زنجیره‌ای، گروه‌های قطبی (باندهای هیدروژنی و باقی مانده اسیدهای آمینه قطبی) و اتصالات عرضی (اتصالات عرضی دی سولفیدی و پل‌های نمکی) می‌توانند منجر به افزایش دمای انتقال شیشه‌ای گردند (۳۹).

داناتوراسیون ایزوله پروتئین آب پنیر ۷۰/۶ می‌باشد که در محدوده‌ی گزارش شده تحقیقات قبلی می‌باشد (۳۶)، با افزودن اینولین در حالت مخلوط، دمای داناتوراسیون و آنتالپی نمونه‌ها کاهش یافت. مائو و همکاران (۲۰۱۴) نیز گزارش دادند که با مخلوط شدن پکتین و ایزوله پروتئین آب پنیر دمای داناتوراسیون کاهش یافته است. رفتارهای حرارتی مختلف ایزوله پروتئین آب پنیر در غیاب و حضور پلی ساکارید می‌تواند نشان دهنده برهمکنش‌های بین این بیوپلیمر باشد زیرا که برهمکنش‌ها موجب تغییر واکنش حرارتی ایزوله پروتئین آب پنیر می‌گردد (۱۹).

با انکوباسیون ایزوله پروتئین آب پنیر-اینولین و انجام واکنش میلارد، دمای داناتوراسیون نمونه‌ها افزایش و مقدار آنتالپی کاهش یافت. وانگ و اسمایل (۲۰۱۲) گزارش دادند که دمای داناتوراسیون ایزوله پروتئین آب پنیر پس از گلیکاسیون با دکستران در pH=۷ از ۶۸ درجه سانتیگراد تا ۸۵ درجه سانتی‌گراد افزایش داشته است (۳۷). کاهش مقدار آنتالپی کونژوگه‌ها می‌تواند به دلیل بازشدن جزئی ساختار سوم، کاهش ساختار ثانویه پروتئین یا شکستن نیروهای بین مولکولی ایزوله پروتئین آب پنیر در نتیجه پیوند کووالانسی آن با اینولین طی فرایند کونژوگه شدن باشد (۳۷ و ۳۸). به‌طور کلی

جدول ۱ - مقاومت حرارتی ایزوله پروتئین آب پنیر، مخلوط و کونژوگه ایزوله پروتئین آب پنیر - اینولین.

Table 1. Thermal stability of WPI and WPI-Inulin mixtures and conjugates.

| $\Delta H(J/g)$ آنتالپی | $T_g(^{\circ}C)$ دمای انتقال شیشه‌ای ($^{\circ}C$) | $T_d(^{\circ}C)$ دمای داناتوراسیون ($^{\circ}C$) | Sample نمونه |
|----------------------------|---------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-----------------|
| 6.81±0.19 ^{c*} | 56.4±0.19 ^f | 67.3±0.15 ^f | 1:1 (mix) |
| 7.69±0.11 ^b | 53.3±0.09 ^g | 63.1±0.22 ^g | 1w:2 (mix) |
| 6.55±0.08 ^d | 61.2±0.21 ^e | 69.4±0.17 ^e | 2w:1 (mix) |
| 5.95±0.09 ^f | 65.9±0.1 ^b | 72.8±0.20 ^e | 1:1 (CO60) |
| 6.01±0.16 ^e | 64.7±0.16 ^c | 74.5±0.11 ^b | 1w:2 (CO60) |
| 5.42±0.13 ^g | 69.5±0.25 ^a | 74.8±0.23 ^a | 2w:1 (CO60) |
| 7.98±0.07 ^a | 62.9±0.17 ^d | 70.6±0.12 ^d | WPI |

*حروف متفاوت در هر ستون اختلاف معنادار بین نمونه‌ها در سطح ۵ درصد را نشان می‌دهد ($P<0.05$).

Different letters in each column indicate a significant difference at 5% ($p < 0.05$).

نظرگرفت، بخشی از کربوهیدرات مسئول حلالیت در حلال‌های هیدروفیلک است و بخشی از پروتئین به‌عنوان فعال سطحی عمل می‌نماید (۴۳). بنابراین انتظار می‌رود که کونژوگه‌های پروتئین- پلی ساکارید از خواص امولسیون‌کنندگی خوبی برخوردار باشند (۴۴). شاخص فعالیت امولسیون‌کنندگی به تعداد گروه‌های قابل دسترسی و سرعت مهاجرت مولکولی مرتبط است (۲۶). استفاده از دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد جهت انکوباسیون ایزوله پروتئین آب پنیر - اینولین و انجام واکنش میلارد قابلیت دسترسی گروه‌های فعال موجود در قسمت‌های داخلی پروتئین را افزایش داده که این امر منجر به افزایش شاخص فعالیت امولسیون‌کنندگی می‌گردد. دونگ و همکاران (۲۰۲۰) افزایش قابل توجهی را در فعالیت امولسیون‌کنندگی و شاخص پایداری امولسیون کونژوگه‌های صمغ دانه کتان- ایزوله پروتئین آب پنیر گزارش دادند، این محققین این افزایش را به قابلیت تطابق پروتئین ایزوله پروتئین آب پنیر برای در معرض قرار دادن گروه‌های آبگریز و باقیمانده‌های لیزیل موجود در بخش‌های داخلی که می‌توانند به‌راحتی با گروه‌های کربونیل پلی ساکاریدها واکنش دهند، نسبت دادند (۵). شاخص پایداری امولسیون مرتبط با ضخامت فیلم سطحی و بار روی سطح قطره است (۱۹). شاخص پایداری امولسیون‌های تولیدی با کونژوگه‌های میلارد در مقایسه با نمونه‌های مخلوط ایزوله پروتئین آب پنیر- اینولین و همچنین ایزوله آب پنیر به تنهایی بالاتر بود که با نتایج دونگ و همکاران (۲۰۲۰) و شی و همکاران (۲۰۱۹) مطابقت داشت (۵) و (۲۶). همچنین مقدار ویسکوزیته امولسیون‌های تولیدی با کونژوگه‌های ایزوله پروتئین آب پنیر- اینولین بالاتر از سایر نمونه‌ها بود که برای جذب در سطح روغن - آب سودمند است و در نتیجه باعث بهبود شاخص فعالیت امولسیون‌کنندگی می‌شود (۲۶).

نتایج این پژوهش بیانگر این مطلب است که نسبت ۲:۱ ایزوله پروتئین آب پنیر - اینولین بالاترین دمای انتقال شیشه‌ای و دناتوراسیون را در حالت مخلوط و کونژوگه داشته است. افزایش نسبت ایزوله پروتئین آب پنیر منجر به افزایش وزن مولکولی متوسط سیستم می‌گردد. سیستم‌هایی با وزن مولکولی بالاتر دمای انتقال شیشه‌ای بالاتری دارند (۴۰) که این امر منجر به افزایش دمای دناتوراسیون نیز می‌گردد.

فعالیت امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون:

ویژگی‌های امولسیون‌کنندگی نقش بارزی در سیستم‌های غذایی دارند، زیرا مستقیماً در بافت و ویژگی‌های حسی مواد غذایی تأثیر گذارند. پروتئین‌ها و پلی ساکاریدها نقش مهمی در تثبیت امولسیون‌ها دارند، پروتئین‌ها در سطوح آب-روغن جذب می‌شوند و یک لایه‌ی ویسکوالاستیک تشکیل می‌دهند، در حالی که پلی ساکاریدها از طریق ایجاد ژل و افزایش غلظت فاز آبی باعث ثبات کلئیدی می‌شوند (۴۱). شاخص فعالیت امولسیون‌کنندگی (EAI) و شاخص پایداری امولسیون (ESI) نمونه‌ها در جدول ۲ مشخص شده است. شاخص فعالیت امولسیون‌کنندگی نشان دهنده توانایی امولسیفایرها جهت جذب شدن به سطوح روغن/آب در حین همگن سازی، تسهیل تجزیه قطرات و در نتیجه تثبیت قطرات امولسیون است (۴۲). شاخص فعالیت امولسیون‌کنندگی نمونه‌ها در محدوده ۵۵/۲۳-۶۹/۵۰ متر مربع بر گرم و شاخص پایداری امولسیون در محدوده ۱۷/۷۵-۳۳/۱۶ دقیقه قرار داشت. نتایج نشان دادند که امولسیون‌های تولید شده با کونژوگه‌های ایزوله پروتئین آب پنیر و اینولین شاخص فعالیت امولسیون‌کنندگی و شاخص پایداری امولسیون بالاتری نسبت به نمونه‌های مخلوط و ایزوله پروتئین آب پنیر داشتند. کونژوگه‌های پروتئین - پلی ساکارید را می‌توان به عنوان دو بلوک در

امولسیون می‌شوند (۵). خصوصیات امولسیون کنندگی پروتئین‌ها اساساً به علت کاهش قابل توجه جذب سطحی به دلیل جذب پروتئین در سطح آب-روغن و تشکیل یک مانع الکترواستاتیک مکانیکی و ساختاری است که قادر به جلوگیری از ناپایداری قطرات می‌باشد (۴۵).

امولسیون‌های تثبیت شده با نسبت ۲:۱ ایزوله پروتئین آب پنیر- اینولین در حالت مخلوط و کونژوگه بیشترین شاخص فعالیت امولسیون کنندگی و پایداری امولسیون را نشان دادند. پروتئین‌های موجود در امولسیون‌ها پتانسیل بهتری جهت جذب در سطوح روغن - آب دارند و در نتیجه باعث افزایش خواص

جدول ۲- فعالیت امولسیون کنندگی و پایداری امولسیون

Table 2- Emulsification activity index (EAI) and emulsion stability index (ESI).

| EAI (m ² /g) فعالیت امولسیون کنندگی | ESI (min) پایداری امولسیون (دقیقه) | Sample نمونه |
|---------------------------------------------------|---------------------------------------|-----------------|
| 59.32±0.31 ^e | 22.23±0.26 ^{e*} | 1:1 (mix) |
| 59.48±0.11 ^e | 21.75±0.21 ^f | 1w:2 (mix) |
| 59.98±0.25 ^d | 23.14±0.19 ^d | 2w:1 (mix) |
| 66.37±0.16 ^b | 32.13±0.18 ^b | 1:1 (CO60) |
| 65.13±0.18 ^c | 31.51±0.21 ^c | 1w:2 (CO60) |
| 69.5±0.14 ^a | 33.16±0.36 ^a | 2w:1 (CO60) |
| 55.23±0.18 ^f | 17.75±0.15 ^g | WPI |

*حروف متفاوت در هر ستون اختلاف معنادار بین نمونه‌ها در سطح ۵ درصد را نشان می‌دهد (P<۰/۰۵).

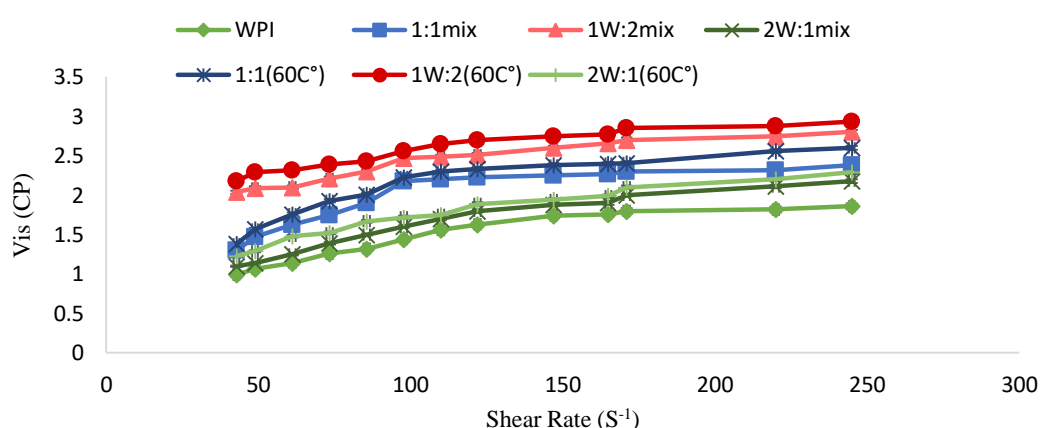
Different letters in each column indicate a significant difference at 5% (p < 0.05).

ساخت که ویسکوزیته ظاهری امولسیون‌های تثبیت شده با کونژوگه‌های ایزوله پروتئین آب پنیر- اینولین بیشتر از ویسکوزیته امولسیون‌های تثبیت شده با مخلوط ایزوله پروتئین آب پنیر- اینولین در نسبت‌های یکسان بود (P<۰/۰۵). این امر می‌تواند به علت افزایش تشکیل کونژوگه‌هایی با وزن مولکولی بالا در اثر واکنش میلارد باشد که در برابر جریان مقاومت می‌کنند و سبب افزایش ویسکوزیته امولسیون‌ها می‌شوند (۶). تاثیرات نسبت ایزوله پروتئین آب پنیر و اینولین بر ویسکوزیته امولسیون‌های حاصل از مخلوط و کونژوگه‌های تولید شده در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد روند یکسانی داشت، به طوری که ویسکوزیته امولسیون ایزوله پروتئین آب پنیر: اینولین ۱:۲ < ایزوله پروتئین آب پنیر: اینولین ۱:۱ < ایزوله پروتئین آب پنیر: اینولین ۲:۱ بود (P<۰/۰۵). این روند بر این امر دلالت دارد که اینولین نقش بسزایی در افزایش ویسکوزیته

ویسکوزیته امولسیون‌ها: ویسکوزیته امولسیون‌ها به عوامل مختلفی مانند غلظت فاز پراکنده، تعامل بین ذرات، ویسکوزیته فاز خارجی، ویسکوزیته فاز داخلی، اثر الکتروویسکوز، امولسیفایرها و ساختار شیمیایی آن‌ها، ویژگی‌های فیزیکی فیلم جذب شده در سطوح روغن- آب، توزیع اندازه ذرات و فرایند هم‌وزن‌سازی بستگی دارد (۴۶). شکل ۴ ویسکوزیته ظاهری امولسیون‌ها را نشان می‌دهد. امولسیون‌های تثبیت شده با ایزوله پروتئین آب پنیر به تنهایی و کونژوگه ایزوله پروتئین آب پنیر- اینولین با نسبت وزنی ۱:۲ به ترتیب کمترین و بیشترین مقدار ویسکوزیته را نشان دادند (P<۰/۰۵) این امر نشان دهنده‌ی نقش بارز پلی ساکاریدها و واکنش میلارد بر مقدار ویسکوزیته امولسیون‌ها می‌باشد. زو و همکاران (۲۰۱۲) گزارش دادند که با افزودن پکتین چغندر به ایزوله پروتئین آب پنیر در حالت مخلوط و کونژوگه مقدار ویسکوزیته افزایش می‌یابد (۲۱). نتایج مشخص

آبی منجر به افزایش ویسکوزیته می‌شود. شدت افزایش ویسکوزیته به پارامترهای متعددی مانند نسبت پروتئین به پلی ساکارید، اتصالات و پیوندهای پروتئین- پلی ساکارید و شرایط کونژوگه شدن بستگی دارد (۴۸). خصوصیات رئولوژیکی امولسیون‌ها به شدت تحت تاثیر ماهیت برهم کنش‌های بین قطرات موجود در آنهاست که با تغییرات ویژگی‌های سطحی مانند ضخامت، بار و آبگریزی تعدیل می‌شود (۴۹).

امولسیون‌ها دارد. اتصال ایزوله پروتئین آب پنیر به ساختار مولکولی اینولین منجر به تشکیل پلیمری هیبرید می‌شود که باعث افزایش ویسکوزیته امولسیون‌ها می‌گردد. وجود اینولین در فاز پیوسته امولسیون از طریق انبوهش تخلیه‌ای قطرات منجر به افزایش ویسکوزیته می‌گردد (۴۷). گوش و باندوپادایی (۲۰۱۲) گزارش دادند که افزودن کمپلکس پلی ساکارید- پروتئین هیدراته به سیستم‌های



شکل ۴- ویسکوزیته ظاهری امولسیون‌های تثبیت شده ایزوله پروتئین آب پنیر، مخلوط و کونژوگه ایزوله پروتئین آب پنیر- اینولین در نسبت‌های وزنی مختلف.

Figure 4- Apparent viscosity (Cp) of emulsions stabilized by WPI and WPI-Inulin mixtures and conjugates with different ratio.

امولسیون، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و مقاومت حرارتی را نشان داد. اما بیشترین ویسکوزیته در امولسیون‌های تثبیت شده با نسبت ۱:۲ کونژوگه ایزوله پروتئین آب پنیر - اینولین مشاهده گردید. با توجه به افزایش خصوصیات عملکردی کونژوگه ایزوله پروتئین آب پنیر- اینولین، می‌توان در فرمولاسیون‌های غذایی مختلف مانند انواع سس‌ها، فراورده‌های لبنی و محصولات رژیمی از این کونژوگه‌ها استفاده نمود.

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش نسبت‌های مختلف وزنی ایزوله پروتئین آب پنیر- اینولین به صورت مخلوط و کونژوگه میلارد تهیه شدند. نتایج مشخص ساخت کونژوگه‌های میلارد ویژگی‌های عملکردی بهتری نسبت به مخلوط پروتئین - پلی ساکاریدی دارند. کونژوگه ایزوله پروتئین آب پنیر- اینولین با نسبت ۲:۱ بالاترین فعالیت امولسیون کنندگی و پایداری

References

1. Qi, P.X., Xiao, Y. and Wickham, E.D. 2017. Stabilization of whey protein isolate (WPI) through interactions with sugar beet pectin (SBP) induced by

controlled dry-heating. Food Hydrocolloids. 67:1-13.

2. Chen, W., Lv, R., Wang, W., Ma, X., Muhammad, A.I., Guo, M., Ye, X. and Liu, D. 2019. Time effect on structural

- and functional properties of whey protein isolate-gum acacia conjugates prepared via Maillard reaction. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 99: 4801-4807.
3. De Oliveira, F.C., Coimbra, J.S.D.R., de Oliveira, E.B., Zuñiga, A.D.G., and Rojas, E.E.G. 2016. Food protein-polysaccharide conjugates obtained via the Maillard reaction: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 56: 1108-1125.
 4. Li, M., McClements, D.J., Liu, X., and Liu, F. 2020. Design principles of oil-in-water emulsions with functionalized interfaces: Mixed, multilayer, and covalent complex structures. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 19: 3159-3190.
 5. Dong, X., Du, S., Deng, Q., Tang, H., Yang, C., Wei, F., Chen, H., Quek, S.Y., Zhou, A. and Liu, L. 2020. 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.
 6. Nooshkam, M., and 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.
 7. Shoaib, M., Shehzad, A., Omar, M., Rakha, A., Raza, H., Sharif, H.R., Shakeel, A., Ansari, A. and Niazi, S. 2016. Inulin: Properties, health benefits and food applications. *Carbohydrate polymers*. 147:444-454.
 8. Morris, C. and Morris, G.A. 2012. The effect of inulin and fructo-oligosaccharide supplementation on the textural, rheological and sensory properties of bread and their role in weight management: A review. *Food chemistry*. 133: 237-248.
 9. Ghasab-nezhad, M., Hojjati, M., and Jooyandeh, H. 2019. Effect of inulin on physico-chemical, microbial and sensory properties of the kefir produced of buffalo milk. *Journal of Food Science and Technology*. 89:357-367.
 10. Bitaraf, M.S., Khodaiyan, F., and Hosseini, S.S. 2018. Rheological properties of probiotic non-fat yogurt containing *Lactobacillus reuteri*: Effects of inulin addition, inoculum level and fermentation temperature. *Journal of Food and Bioprocess Engineering*. 1: 109-116.
 11. Sadeghi, S., Madadlou, A., and Yarmand, M. 2014. Microemulsification –cold gelation of whey proteins for nanoencapsulation of date palm pit extract. *Food Hydrocolloids*. 35: 90-596.
 12. Pirestani, S., Nasirpour, A., Keramat, J., Desobry, S. and Jasniewski, J. 2018. Structural properties of canola protein isolate-gum Arabic Maillard conjugate in an aqueous model system. *Food Hydrocolloids*. 79: 228-234.
 13. Laemmli, Ulrich K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
 14. Nooshkam, M. and Madadlou, A. 2016. Maillard conjugation of lactulose with potentially bioactive peptides. *Food Chemistry*. 192:831-836.
 15. Schmidt, U.S., Pietsch, V.L., Rentschler, C., Kurz, T., Endreß, H.U., and Schuchmann, H.P. 2015. Influence of the degree of esterification on the emulsifying performance of conjugates formed between whey protein isolate and citrus pectin. *Food Hydrocolloids*. 56:1-8.
 16. Chen, F., Liang, L., Zhang, Z., Deng, Z., Decker, E.A., and McClements, D.J. 2016. Inhibition of lipid oxidation in nanoemulsions and filled microgels fortified with omega-3 fatty acids using casein as a natural antioxidant. *Food Hydrocolloids*. 63:240-248.
 17. De Castro, R.J.S., Domingues, M.A.F., Ohara, A., Okuro, P.K., dos Santos, J.G., Brexó, R.P., and Sato, H.H. 2017. Whey protein as a key component in food systems: Physicochemical properties, production technologies and applications. *Food structure*. 14:17-29.
 18. Perrechil, F.A., Santana, R.C., Lima, D. B., Polastro, M.Z., and Cunha. R.L. 2014. Emulsifying properties of maillard conjugates produced from sodium caseinate and locust bean gum. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 31:429 - 438.
 19. Mao, L., Boiteux, L., Roos, Y.H., and Miao, S. 2014. Evaluation of volatile characteristics in whey protein isolate-pectin mixed layer emulsions under

- different environmental conditions. *Food Hydrocolloids*. 41:79-85.
20. Gómez-Ordóñez, E., and Rupérez, P. 2011. FTIR-ATR spectroscopy as a tool for polysaccharide identification in edible brown and red seaweeds. *Food hydrocolloids*. 25:1514-1520.
 21. Zhu, X., Jia, C., Meng, X., Xing, M., Yi, Y., and Gao, X. 2018. Synthesis, characterization of inulin propionate ester, and evaluation of its in vitro effect on SCFA production. *Starch-Stärke*, 70:1800037.
 22. Ozel, B., Aydin, O., and Oztop, M.H. 2020. In vitro digestion of polysaccharide including whey protein isolate hydrogels. *Carbohydrate polymers*. 229:115469.
 23. Ye, M.P., Zhou, R., Shi, Y.R., Chen, H.C., and Du, Y. 2017. Effects of heating on the secondary structure of proteins in milk powders using mid-infrared spectroscopy. *Journal of Dairy Science*. 100: 89-95.
 24. Xu, D., Wang, X., Jiang, J., Yuan, F., and Gao, Y. 2012. Impact of whey protein-Beet pectin conjugation on the physicochemical stability of β -carotene emulsions. *Food Hydrocolloids*. 28: 258-266.
 25. González-Martínez, D.A., Carrillo-Navas, H., Barrera-Díaz, C.E., Martínez-Vargas, S.L., Alvarez-Ramírez, J., and Pérez-Alonso, C. 2017. Characterization of a novel complex coacervate based on whey protein isolate-tamarind seed mucilage. *Food hydrocolloids*. 72:115-126.
 26. Shi, Y., Liang, R., Chen, L., Liu, H., Goff, H. D., Ma, J., and Zhong, F. 2019. The antioxidant mechanism of Maillard reaction products in oil-in-water emulsion system. *Food Hydrocolloids*. 87:5 82-592.
 27. Apolinário, A.C., de Carvalho, E.M., de Lima Damasceno, B.P.G., da Silva, P.C.D., Converti, A., Pessoa Jr, A., and da Silva, J.A. 2017. Extraction, isolation and characterization of inulin from Agave sisalana boles. *Industrial Crops and Products*. 108:355-362.
 28. Nooshkam, M., Varidi, M., and 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.
 29. Tan, S., Zhong, C., and Langrish, T. 2020. Pre-gelation assisted spray drying of whey protein isolates (WPI) for microencapsulation and controlled release. *LWT*. 117:108625.
 30. Barth, A. 2007. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 1767: 1073-1101.
 31. Kim, J.S., and Lee, Y.S. 2009. Study of Maillard reaction products derived from aqueous model systems with different peptide chain lengths. *Food Chemistry*. 116: 846-853.
 32. Lertittikul, W., Benjakul, S., and Tanaka, M. 2007. Characteristics and antioxidative activity of Maillard reaction products from a porcine plasma protein-glucose model system as influenced by pH. *Food Chemistry*. 100: 669-677.
 33. Gu, F.L., Kim, J.M., Abbas, S., Zhang, X.M., Xia, S.Q., and Chen, Z.X. 2010. Structure and antioxidant activity of high molecularweight Maillard reaction products from casein-glucose. *Food Chemistry*. 120:505-511.
 34. Jiang, Z., and Brodkorb, A. 2012. Structure and antioxidant activity of Maillard reaction products from α -lactalbumin and β -lactoglobulin with ribose in an aqueous model system. *Food Chemistry*. 133:960-968.
 35. Roos, Y. 2010. Glass transition temperature and its relevance in food processing. *Annual review of food science and technology*. 1:469-496.
 36. He, Y. and Vardhanabhuti, B. 2021. Improved Heat Stability of Whey Protein Isolate by Glycation with Inulin. *Dairy*. 2:135-147.
 37. Wang, Q., and Ismail, B. 2012. Effect of Maillard-induced glycosylation on the nutritional quality, solubility, thermal stability and molecular configuration of whey protein. *International Dairy Journal*. 25: 112-122.
 38. Spotti, M.J., Martinez, M.J., Pilosof, A. M., Candiotti, M., Rubiolo, A.C., and Carrara, C.R. 2014. Rheological properties of whey protein and dextran conjugates at different reaction times. *Food Hydrocolloids*. 38: 76-84.
 39. Bier, J.M., Verbeek, C.J., and Lay, M.C. 2014. Thermal Transitions and Structural Relaxations in Protein-B used Thermoplastics. *Macromolecular materials and engineering*. 299:524-539.

40. Slade, L., and Levine, H. 1995. Water and the glass transition—dependence of the glass transition on composition and chemical structure: special implications for flour functionality in cookie baking. *Journal of Food Engineering*. 24: 431-509.
41. Ru, Q., Cho, Y. and Huang, Q. 2009. Biopolymer-stabilized emulsions on the basis of interactions between β -lactoglobulin and κ -carrageenan. *Frontiers of Chemical Science and Engineering in China*. 3: 399-406.
42. Liu, J., Liu, W., Salt, L.J., Ridout, M.J., Ding, Y., and Wilde, P.J. 2018. Fish oil emulsions stabilized with caseinate glycosylated by dextran: Physicochemical stability and gastrointestinal fate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 67: 452-462.
43. O'Mahony, J.A., Drapala, K.P., Mulcahy, E.M., and Mulvihill, D.M. 2017. Controlled glycation of milk proteins and peptides: Functional properties. *International Dairy Journal*. 67:16-34.
44. Kato, A. 2002. Industrial applications of Millard-type protein– polysaccharide conjugates. *Journal of Food Science and Technology*. 8:193-199.
45. Wagner, J.R. and Gueguen, J. 1999. Surface functional properties of native, acid-treated, and reduced soy glycinin. Emulsifying properties. *J. Agric. Food Chem*. 47:2181–2187.
46. Plasencia, J., Pettersen, B. and Nydal, O.J. 2013. Pipe flow of water-in-crude oil emulsions: effective viscosity, inversion point and droplet size distribution. *Journal of Petroleum Science and Engineering*. 101: 35- 43.
47. Mantzouridou, F., Spanou, A., and Kiosseoglou, V. 2012. An inulin-based dressing emulsion as a potential probiotic food carrier. *Food Research International*. 46:260-269.
48. Ghosh, A.K., and Bandyopadhyay, P. 2012. Polysaccharide - protein interactions and their relevance in food colloids. *The complex world of polysaccharides*. 14:395-406.
49. McClements, D.J., and Jafari, S.M. 2018. Improving emulsion formation, stability and performance using mixed emulsifiers: A review. *Advances in colloid and interface science*. 251:55-79.