



اثر زمان اعمال تیمار حرارتی پروتئین بر ویژگی‌های کمپلکس صمغ کتیرا-ایزوله پروتئین آب‌پنیر

نسیم رئوفی^۱، رسول کدخدائی^{۲*}، مسعود نجف نجفی^۳

^۱دانش آموخته دکتری، گروه نانوفناوری مواد غذایی، موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران

^۲دانشیار، گروه نانوفناوری مواد غذایی، موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران

^۳دانشیار، گروه صنایع غذایی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، سازمان تحقیقات،

آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۰۶؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۸/۰۲

چکیده

سابقه و هدف: صمغ کتیرا در زمره صمغ‌های ترش‌چی با کاربردهای متنوع در صنایع غذایی و دارویی است. متأسفانه اطلاعات محدودی در خصوص اتصالات الکترواستاتیک این صمغ با پروتئین‌ها به خصوص پروتئین‌های دناتوره شده در دسترس است. به همین دلیل هدف اصلی پژوهش حاضر بررسی اثر اعمال حرارت بر ویژگی‌های ایزوله پروتئین آب‌پنیر و کمپلکس‌های حاصله با صمغ کتیرا می‌باشد.

مواد و روش‌ها: ابتدا اثر مدت زمان اعمال تیمار حرارت‌دهی ایزوله پروتئین آب‌پنیر (۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۳۵ دقیقه) در درجه حرارت ۸۰ درجه سانتی‌گراد بر کدورت محلول‌های پروتئینی و کمپلکس صمغ کتیرا-ایزوله پروتئین آب‌پنیر ($r = 0/1$) در $pH = 4$ و غلظت کلی ۰/۱٪ مورد بررسی قرار گرفت. سپس رفتار جریان و ویسکوزیته کمپلکس صمغ کتیرا-ایزوله پروتئین آب‌پنیر در درجه برش صفر تا ۱۰۰ بر ثانیه با محلول‌های خالص صمغ و پروتئین مقایسه شد. با توجه به این که بیشترین میزان کدورت در محدوده حرارتی ۱۵-۳۵ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد، اثر سه تیمار حرارتی (۱۵، ۲۵ و ۳۵ دقیقه) و همچنین ۶ نسبت ایزوله پروتئین آب‌پنیر حرارت دیده به صمغ کتیرا (۲:۱، ۱:۱، ۱:۲، ۱:۵، ۱:۱۰ و ۱:۲۰) بر میزان ترکیبات تشکیل دهنده دو فاز توسط آزمون‌های لوری و فنل-سولفوریک اسید مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: با افزایش زمان حرارت‌دهی، کدورت نمونه‌های پروتئین خالص، به‌طور معنی‌داری تغییر یافت؛ به‌طوری‌که بیشترین کدورت پس از ۲۵ دقیقه حرارت‌دهی حاصل شده بود. اما این محلول‌ها به دلیل تشکیل توده‌های پروتئینی ناشی از برهم‌کنش پروتئین-پروتئین، بسیار ناپایدار بودند. با افزودن صمغ کتیرا به محلول پروتئین حرارت دیده به‌دلیل تشکیل کمپلکس‌های پروتئین-پلی‌ساکارید افزایش معنی‌داری در پایداری آن‌ها مشاهده شد ($p < 0/05$). به‌صورت مشابه در کمپلکس‌های پروتئین-پلی‌ساکارید نیز بیشترین میزان کدورت در نمونه‌ای که پروتئین آن به مدت ۲۵ دقیقه حرارت داده شده بود مشاهده شد. بررسی رفتار جریان کمپلکس نشان دهنده رفتار سودوپلاستیک همراه با ایجاد حلقه هیستریسیس در منحنی‌های رفت و برگشت بود. همچنین افزایش چشمگیری در ویسکوزیته محلول کمپلکس نسبت به نمونه‌های خالص صمغ و پروتئین حاصل شد که همگی تأییدی بر ایجاد کمپلکس بین صمغ کتیرا و ایزوله پروتئین آب‌پنیر حرارت دیده است. محاسبات نشان داد کمترین نسبت

*مسئول مکاتبه: r.kadkhodae@rifst.ac.ir

پروتئین به صمغ در فاز رسوب مربوط به نمونه‌ای است که پروتئین آن به مدت ۲۵ دقیقه در معرض حرارت ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته است. همچنین با افزایش نسبت پروتئین آب‌پنیر به صمغ کتیرا در مخلوط، این نسبت در فاز رسوب نیز افزایش چشمگیری پیدا کرد.

نتیجه‌گیری: در اثر افزودن صمغ کتیرا به محلول پروتئین پایداری زیادی در محلول‌های پروتئینی ایجاد می‌شود که حاصل برهم‌کنش الکترواستاتیک صمغ با پروتئین است. تیمار حرارتی ایزوله پروتئین آب‌پنیر باعث افزایش کدورت و در نتیجه افزایش راندمان تشکیل کمپلکس‌های صمغ کتیرا- پروتئین آب‌پنیر می‌شود که دلیل آن باز شدن ساختار پروتئین و در دسترس قرار گرفتن گروه‌های عملگرایی پروتئین است.

واژه‌های کلیدی: پروتئین آب‌پنیر، صمغ کتیرا، کدورت، کمپلکس، ویسکوزیته

مقدمه

پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها بیوپلیمرهای طبیعی با کاربردهای گسترده در صنایع غذایی و دارویی هستند (۹). به‌طور معمول خصوصیات کارکردی این دو بیوپلیمر در کنار یکدیگر بهتر می‌شود، در نتیجه تحقیق پیرامون برهم‌کنش آن‌ها به‌منظور کنترل ساختار و بافت مواد غذایی فرآوری شده حائز اهمیت است (۴ و ۲۹). با کنترل و شناخت عمیق‌تر مکانیسم برهم‌کنش این بیوماکرومولکول‌ها روش‌های فرآوری مواد غذایی توسعه می‌یابد (۷).

اعمال فرآیندهای حرارتی بر پروتئین‌های آب‌پنیر معمولاً بسته به شرایط حرارتی باعث تغییرات ساختمانی (دنا تراسیون) آن‌ها می‌شود که طی آن ساختمان پروتئین باز شده و گروه‌های عاملی بیشتری در دسترس قرار می‌گیرند. طی این فرآیند ابتدا پروتئین ایمونوگلوبولین و پس از آن سرم آلبومین دچار تغییرات ساختمانی شده و سپس توده‌های^۱ کوچک بتالاکتوگلوبولین تشکیل می‌شوند که اندازه آن‌ها در اثر افزایش دما یا زمان حرارت‌دهی به مرور افزایش پیدا می‌کند. مقاوم‌ترین فراکسیون پروتئین آب‌پنیر نسبت به حرارت فراکسیون آلفالاکتالبومین است که با افزایش دما یا زمان حرارت‌دهی دناتوره می‌شود (۸ و ۱۷). با توجه به این ویژگی پروتئین‌های آب‌پنیر که در دما و pHهای خاص تولید توده می‌کنند امکان توده‌ای شدن ثانویه در برخی موارد هنگام حرارت دادن و فرآوری محصولات حاوی پروتئین وجود دارد که منجر به ایجاد بافت سنی می‌شود. افزودن پلی-ساکاریدها به این سیستم‌های پروتئینی باعث ایجاد حفاظ در برابر گروه‌های باردار پروتئین و همچنین بردن ویسکوزیته محیط و کاهش سرعت برهم‌کنش پروتئین‌ها شده و در نتیجه برهم‌کنش‌های پروتئین-

پروتئین را به حداقل رسانده و از توده‌ای شدن بیشتر آن‌ها جلوگیری می‌کند.

عموماً محلول‌های پروتئین- پلی‌ساکارید از لحاظ ترمودینامیکی می‌توانند سازگار یا ناسازگار باشند. در حالت ناسازگاری ترمودینامیکی، دو بیوپلیمر با یکدیگر برهم‌کنش نداده و به صورت دو فاز کاملاً مجزا از یکدیگر قرار می‌گیرند. در حالت سازگاری ترمودینامیکی دو نوع محلول به دست می‌آید؛ فاز پایدار و هموژن حاوی دو بیوپلیمر و یا سیستم دو فازی که بیوپلیمرها در فاز رسوب با یکدیگر برهم‌کنش داده‌اند. در حالت دوم به دلیل جاذبه‌های الکترواستاتیک بین بیوپلیمرها کمپلکس یا کواسرواسیون مرکب اتفاق می‌افتد. اتصال بین پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدهای آنیونی مثل صمغ کتیرا در حقیقت در pH بین pK_a صمغ و نقطه ایزوالکتریک پروتئین رخ می‌دهد که منجر به تشکیل ساختارهای پیچیده‌ای مثل کمپلکس‌ها، توده‌های پروتئینی و کواسروات‌ها^۲ می‌شود (۲۴). در این خصوص مهم‌ترین عوامل مؤثر بر سازگاری پروتئین- پلی-ساکارید و ویژگی کمپلکس‌های به وجود آمده شامل نسبت پروتئین به پلی‌ساکارید، pH، غلظت کلی، وزن مولکولی بیوپلیمرها و قدرت یونی محیط هستند (۲۲ و ۲۵).

صمغ کتیرا از شاخه‌ها و ساقه گونه‌های جنس *Astragalus*^۳ (گون) ترشح می‌شود و از نظر ظاهری به دو شکل نواری^۴ و ورقه‌ای^۵ مشاهده می‌شود (۲۷). به طور کلی صمغ کتیرا از دو جزء تشکیل شده که به طور فیزیکی به یکدیگر متصل شده‌اند (۱۴)؛ بخشی که ایجاد تورم در آب می‌کند یا باسورین^۶ (۶۰-۷۰٪)

2. Coacervates
3. *Astragalus*
4. Ribbon
5. Flake
6. Bassorin

۱. Aggregate

پروتئین به صمغ در راندمان تشکیل و پایداری کمپلکس‌ها پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

مواد اولیه: نوع نواری ترشحات آسترآگالوسگاس پینوس (صمغ کتیرا) (۶/۳۲٪ رطوبت، ۲/۸٪ خاکستر، ۰/۳۱٪ پروتئین و ۸۴/۹۵٪ کربوهیدرات) از بازار محلی شهر اصفهان تهیه شد. صمغ خام پس از شستشو، خشک و آسیاب شده و جهت دستیابی به ذرات صمغ با اندازه یکسان از الک ۳۰ میکرون عبور داده شد. ایزوله پروتئین آب‌پنیر از شرکت داویسکو (مینی پلیس، مینهسوتا، آمریکا) خریداری شد. حداقل درجه خلوص پروتئین بر اساس آنالیز شرکت سازنده، برابر با ۹۶/۲٪ (بر اساس وزن خشک)، ۱/۵۴٪ خاکستر سولفات و ۵/۰٪ رطوبت بود. سدیم آزاید (به عنوان ماده نگهدارنده با درجه خلوص ۹۹/۵٪) و سدیم هیدروکسید از شرکت سیگما (سنت لوئیس، میسوری، آمریکا) و اسید کلریدریک آزمایشگاهی از شرکت مرک (دارمستد، آلمان) خریداری شدند.

آماده‌سازی محلول‌های پروتئین آب‌پنیر و صمغ کتیرا: جهت تولید محلول‌های ایزوله پروتئین آب‌پنیر و صمغ کتیرا مقدار مشخصی از آن‌ها به کمک ترازوی با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم (مترلر تولدو EL204، شرکت علمی فیشر، انگلستان) توزین و در آب دیونیزه (موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، مشهد، ایران) به مدت دو ساعت توسط همزن مغناطیسی (ایکا، آلمان) با شدت دور ۴۰۰ دور بر دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد همزده شد. سپس محلول‌ها به مدت یک شبانه روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند تا کاملاً هیدراته گردند. به‌منظور جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌ها از سدیم آزاید ۰/۰۲٪ استفاده شد.

و بخش محلول در آب یا تراگاکانتین^۷ (۳۰-۴۰٪) (۲۱). اصولاً صمغ کتیرا یک پلی ساکارید طبیعی با انشعابات بسیار زیاد، ناهمگون و مقاوم به شرایط اسیدی است (۲۵). بیشتر از ۲۰۰۰ گونه آسترآگالوس در مناطق مختلف پراکنده‌اند اما متداول‌ترین انواع صمغ‌های کتیرا آسترآگالوس گامیفر^۸ و آسترآگالوس میکروسفالوس^۹ می‌باشد (۳۲).

بررسی‌ها نشان می‌دهد اتصالات صمغ کتیرا (آسترآگالوس گامیفر) و پروتئین‌های شیر عمدتاً از نوع الکترواستاتیک است؛ به عنوان مثال گرجی و همکاران (۲۰۱۴) در بررسی اتصالات بین صمغ کتیرا و سدیم کازئینات ماهیت الکترواستاتیک بودن پیوندها را ثابت کردند. آن‌ها همچنین نشان دادند بسته به شرایط اسیدی محیط انواع مختلفی از کمپلکس‌ها تشکیل می‌شوند (۷). فیروز و همکاران (۲۰۱۲) نیز تغییرات ساختار بتالاکتوگلوبولین-تراگاکانتین را طی اسیدیفیکاسیون مورد بررسی قرار دادند (۶). نصیرپور و همکاران (۲۰۱۳) نیز ضمن اثبات ماهیت الکترواستاتیک پیوند صمغ کتیرا و بتالاکتوگلوبولین، نشان دادند تشکیل کمپلکس‌ها بستگی به غلظت کلی بیوپلیمرهای موجود در محیط دارد به طوری که با افزایش غلظت (۰/۱ تا ۰/۲) pH تشکیل کمپلکس به سمت pH‌های بالاتر سوق پیدا می‌کند (۱۸).

با توجه به اینکه تاکنون پژوهشی در خصوص اعمال تیمار حرارتی بر ایزوله پروتئین آب‌پنیر به منظور افزایش برهم‌کنش‌های الکترواستاتیک بین صمغ کتیرا و پروتئین آب‌پنیر صورت نگرفته است، در این پژوهش به بررسی اثر مدت زمان حرارت دهی پروتئین در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد که دناتوراسیون پروتئین آب‌پنیر است (۱۹) و همچنین اثر نسبت

7. Tragacanthin

8. *Astragalus gummifer*

9. *Astragalus microcephalus*

شدند. به این ترتیب که نمونه‌ها در کووت از جنس کوارتز با طول عبور نور ۱ سانتی‌متر ریخته شدند و جذب در دمای محیط (25 ± 2 درجه سانتی‌گراد) اندازه‌گیری شد. برای کلیه نمونه‌ها از آب مقطر به‌عنوان نمونه شاهد استفاده شد (۲۸).

اندازه‌گیری ویسکوزیته و حلقه هیسترسیس:
ویژگی‌های رفتار جریان محلول پروتئین خالص تیمار حرارتی شده (به مدت ۲۵ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد)، پراکنش صمغ کتیرا و همچنین محلول کمپلکس این دو بیوپلیمر ($r=0/1$) توسط ویسکومتر چرخشی (RV) (بروکفیلد، آمریکا) با اسپیندل SC4-18 در دمای $25 \pm 0/5$ درجه سانتی‌گراد تحت درجه برش $S^{-1} 100-10$ به صورت رفت و برگشت تعیین شد. همچنین حلقه هیسترسیس بر اساس تفاوت انتگرال منحنی رفت و برگشت توسط نرم‌افزار curveexpert pro (مدل 2.0.4) محاسبه گردید. به منظور ثابت نگهداشتن سایر شرایط آزمایشگاهی غلظت تمامی نمونه‌ها ۰/۱٪ انتخاب شد و برای هر نمونه ۶/۸ میلی‌لیتر از محلول مورد آزمایش قرار گرفت (۳۱).

درصد ذرات 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 سرم آلبومین گاوی و محتوای پلی ساکارید با استفاده از آزمایش فنل-سولفوریک اسید تعیین شد.

جهت انجام آزمایش لوری ۲ میلی‌لیتر نمونه با ۲/۸ میلی‌لیتر محلول لوری (کربنات سدیم: سولفات مس: تارتارات مضاعف سدیم-پتاسیم به نسبت ۱۰۰:۱:۱) مخلوط و ورتکس و به مدت ۲۰ دقیقه در محیط تاریک قرار داده شد. سپس به آن ۰/۴ میلی‌لیتر محلول رقیق شده فولین (فولین: آب دیونیزه به نسبت

اعمال تیمار حرارتی بر محلول ایزوله پروتئین آب پنیر: ۱۰ میلی‌لیتر محلول ۰/۱٪ ایزوله پروتئین آب پنیر در لوله آزمایش ریخته و pH آن‌ها در عدد $7 \pm 0/1$ تنظیم شد. درب لوله‌ها توسط فویل آلومینیوم بسته شد تا از تبخیر آب جلوگیری شود. سپس نمونه‌ها به مدت ۵ الی ۳۵ دقیقه در بن ماری (جولابو، آمریکا) ۸۰ درجه سانتی‌گراد حرارت‌دهی شدند و با قرار گرفتن در حمام یخ، سریعاً به دمای محیط رسیدند. در نهایت به کمک اسیدکلریدریک pH نمونه‌ها در ۴ تنظیم و کدورت محلول‌ها بلافاصله پس از تولید (کدورت اولیه) و پس از ۲ ساعت نگهداری در دمای آزمایشگاه (کدورت ثانویه) به روش اشاره شده در بخش سنجش کدورت مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۹).

تهیه پراکنش‌های مخلوط بیوپلیمرها: ابتدا پراکنش‌های صمغ کتیرا 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 برابر با ۴ (بین pK_a صمغ کتیرا و نقطه ایزوالکتریک پروتئین آب پنیر) تنظیم شدند (۲۴). مخلوط‌های پروتئین-پلی ساکارید در غلظت ۰/۱ و نسبت پروتئین به صمغ برابر با ۱:۲۰ الی ۱:۲ در ۳ تکرار تهیه و توسط همزن مغناطیسی (ایکا، آلمان) به مدت ۱ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد مخلوط شدند.

سنجش کدورت: نمونه‌های ۰/۱٪ پروتئین آب پنیر و همچنین مخلوط‌های پروتئین-پلی ساکارید که مطابق بخش‌های قبل آماده شده بودند، پس از ۱ ساعت (کدورت اولیه) و ۲۴ ساعت (کدورت ثانویه) نگهداری در دمای آزمایشگاه به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر (شرکت ای-کروم تکنولوژی، مدل CT-5700، تایوان) در طول موج ۶۰۰ نانومتر ارزیابی

آنالیز واریانس (ANOVA) در سطح اطمینان ۹۵٪ مورد استفاده قرار گرفت. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار اکسل و Design Expert استفاده شد. تمامی آزمون‌ها حداقل در ۳ تکرار انجام شدند.

نتایج و بحث

پایداری محلول‌های پروتئین: اثر زمان حرارت‌دهی محلول ایزوله پروتئین آب‌پنیر بر میزان کدورت اولیه (۱ ساعت پس از تولید) و کدورت ثانویه (۲۴ ساعت پس از تولید) (pH=۴) در شکل ۱ نشان داده شده است. 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 پس از ۲۵ دقیقه حرارت‌دهی به بیشینه مقدار خود رسیده است. با توجه به رابطه مستقیم بین کدورت و اندازه ذرات، دلیل این امر را می‌توان به تشکیل توده‌های بزرگ بتالاکتوگلوبولین مرتبط دانست. بنابراین می‌توان این‌طور نتیجه‌گیری کرد که حداکثر برهم‌کنش‌های پروتئین-پروتئین و تشکیل توده‌ها پس از ۲۵ دقیقه حرارت‌دهی در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد حاصل می‌شود.

۵:۶) اضافه و ورتکس شد و به مدت ۳۰ دقیقه دیگر در محیط تاریک نگهداری شد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر در کووت پلاستیکی با طول عبور نور ۱ سانتی‌متر قرار داده شد (۱۶).

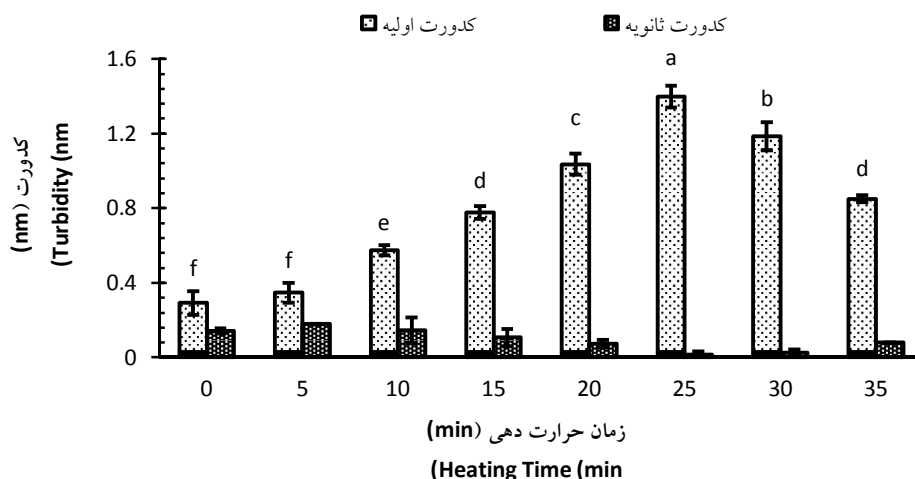
برای انجام آزمایش فنل سولفوریک اسید، به ۱ میلی‌لیتر از نمونه ۵ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک غلیظ و ۱ میلی‌لیتر محلول فنل ۵٪ اضافه و کاملاً ورتکس شد. بعد از ۲۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، جذب با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (شرکت ای-کروم تکنولوژی، مدل CT-5700، تایوان) در طول موج ۴۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (۱، ۵، ۱۱، ۱۵، ۲۰، ۳۵). جهت تعیین درصد رسوب هر بیوپلیمر (پروتئین و یا کربوهیدرات) از رابطه ۱ استفاده شد:

$$B_c = \frac{B_p}{B_s + B_p} \times 100 \quad \text{رابطه ۱}$$

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.

تجزیه و تحلیل آماری

طرح آماری مورد استفاده طرح کاملاً تصادفی در قالب آزمایشات فاکتوریل بود. آنالیز آماری بر اساس



شکل ۱. اثر زمان حرارت‌دهی بر کدورت اولیه و ثانویه محلول ۰/۱٪ ایزوله پروتئین آب‌پنیر در pH = ۴ (حروف کوچک و بزرگ به ترتیب نشان دهنده تفاوت معنی‌داری در سطح اطمینان ۹۵٪ بین کدورت اولیه و کدورت ثانویه می‌باشد. n = ۳)

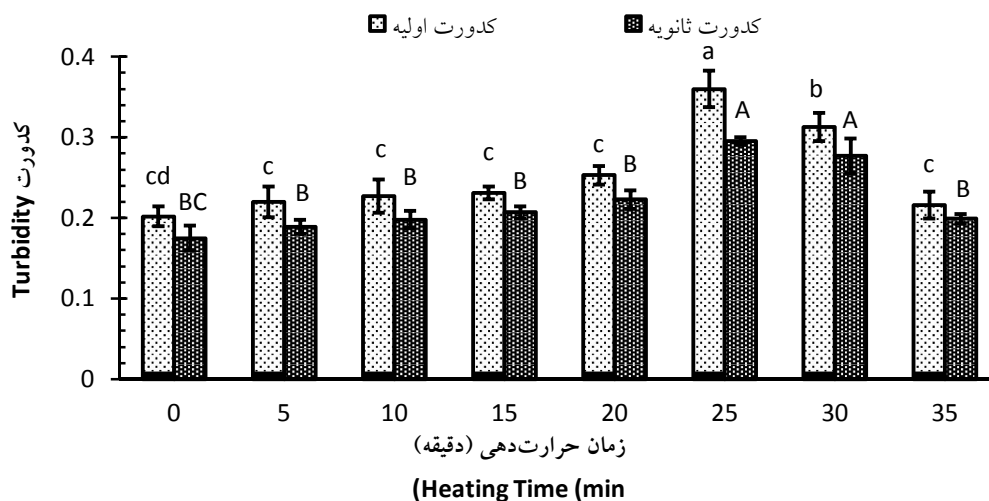
Figure 1. Effect of heating time on primary and secondary turbidity of 0.1% WPI at pH 4 (small and large letters indicates meaningful differences at 95% confidence level between primary and secondary turbidity, respectively. n = 3)

رسوب می‌کنند (۲۹). 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 می‌دهد.

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. کمترین میزان کدورت ثانویه در مورد نمونه‌ای که به مدت ۲۵ دقیقه تحت حرارت قرار گرفته بود نشان می‌دهد میزان پروتئین‌های محلول موجود در آن حداقل ممکن است.

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.

بر اساس نتایج کدورت ثانویه در کلیه نمونه‌های حرارت دیده و همچنین در نمونه شاهد کاهش یافت (شکل ۱)، زیرا در pH نزدیک به نقطه ایزوالکتریک پروتئین، نیروهای الکترواستاتیک در حداقل ممکن خود بوده و مقدار آب کمتری با مولکول‌های پروتئین برهم‌کنش می‌کند؛ از این رو برهم‌کنش‌های پروتئین-پروتئین افزایش می‌یابد که منجر به تشکیل توده‌های بزرگ پروتئین می‌شود که بسیار ناپایدار بوده و



شکل ۲- کدورت اولیه و ثانویه کمپلکس‌های صمغ کتیرا- پروتئین در غلظت ۰/۱٪ و pH = ۴ به عنوان تابعی از زمان اعمال تیمار حرارتی (حروف کوچک و بزرگ به ترتیب نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری در سطح اطمینان ۹۵٪ بین کدورت اولیه و کدورت ثانویه می‌باشد (n = ۳))

Figure 2. Effect of heating time on the GT-WPI turbidity at 0.1% concentration and pH 4 (small and large letters indicates the meaningful differences at 95% confidence level between primary and secondary turbidity, respectively. (n = 3))

مورد کدورت ثانویه است. بر طبق فرضیات سانچز و پاکوین (۱۹۹۷) در pH نزدیک به نقطه ایزوالکتریک پروتئین، جاذبه بین پروتئین‌ها در حداکثر است و توده‌های بزرگی تشکیل می‌شوند. با اضافه کردن صمغ به

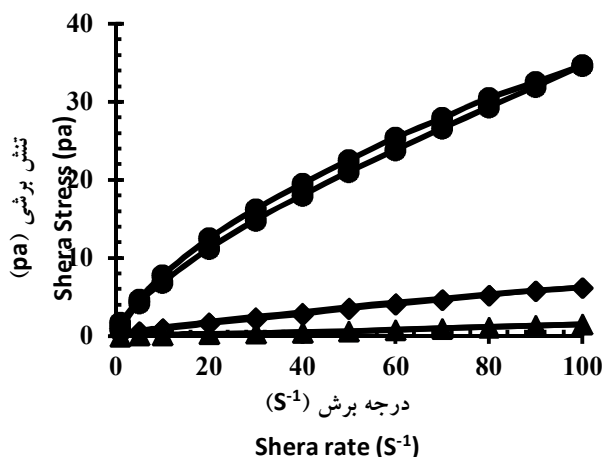
مقایسه پراکنش مخلوط بیوپلیمرها: روند کلی کدورت اولیه پراکنش‌های صمغ- پروتئین متناسب با کدورت‌های اولیه نمونه‌های خالص پروتئین بود (شکل ۲). اما تفاوتی که در مورد پراکنش‌ها وجود دارد در

جزئی بین منحنی‌های رفت و برگشت مشاهده می‌شود، محلول پروتئین رفتار نیوتنی دارد. اما زمانی که صمغ با پروتئین ایجاد کمپلکس می‌کند حلقه هیسترسیس بزرگ‌تری تشکیل می‌شود.

حلقه هیسترسیس در تفسیر برهم‌کنش بیوپلیمرهای غذایی استفاده می‌شود. هرچه هیسترسیس بیشتر باشد اثر سینرژیست بیشتر است (۲، ۳). صمغ کتیرا در $pH=4$ دارای گروه‌های کربوکسیل با بار منفی است که می‌توانند از طریق برهم‌کنش‌های الکترواستاتیک به مناطق مثبت پروتئین آب‌پنیر متصل شوند. به همین دلیل به نظر می‌رسد که این اثر سینرژیستی مهمترین دلیل ایجاد حلقه هیسترسیس در این سامانه‌ها باشد. بوریت و همکاران (۱۹۹۹) در بررسی اثر سینرژیستی میسل‌های کازئین و صمغ‌های گالاتومانان (صمغ دانه خرنوب و گوار) متوجه شدند وقتی غلظت کلی بیوپلیمرها افزایش می‌یابد حلقه هیسترسیس یا تیکسوتروپیک ظاهر می‌شود و در نتیجه پیدایش این اثر سینرژیستی به دلیل آن است که ویسکوزیته مخلوط گالاتومانان و میسل‌های کازئینی به طور چشمگیری بالاتر از مجموع ویسکوزیته‌های هر یک از اجزای موجود در سیستم در همان غلظت می‌باشد (۲، ۳).

این سیستم‌ها از توده‌ای شدن پروتئین جلوگیری شده و اندازه کمپلکس نیز کاهش پیدا می‌کند (۲۳). در اینجا نیز افزودن صمغ کتیرا به محلول پروتئین حرارت دیده باعث افزایش چشمگیری در پایداری و جلوگیری از رسوب پروتئین‌ها در تمامی نمونه‌ها شد که این نشان‌دهنده برهم‌کنش میان پروتئین و صمغ کتیرا است. به‌طورکلی کدورت اولیه و ثانویه تنها در نمونه‌هایی که پروتئین به مدت ۲۵ و ۳۰ دقیقه حرارت دیده بود در حد بیشینه بود و تفاوت چشمگیری با سایر نمونه‌ها داشت، ولی بیشترین پایداری (کمترین تفاوت بین کدورت اولیه و ثانویه) مربوط به نمونه‌ای بود که پروتئین به مدت ۳۵ دقیقه حرارت دیده بودند. از طرف دیگر با مقایسه شکل‌های ۱ و ۲ مشاهده می‌گردد که عموماً کدورت اولیه کمپلکس‌های پروتئین- پلی‌ساکارید کمتر از کدورت محلول پروتئین حرارت دیده است که این موضوع بار دیگر تشکیل شدن ذرات جدید کمپلکس که اندازه کوچکتری نسبت به توده‌های پروتئینی دارند را تأیید می‌کند.

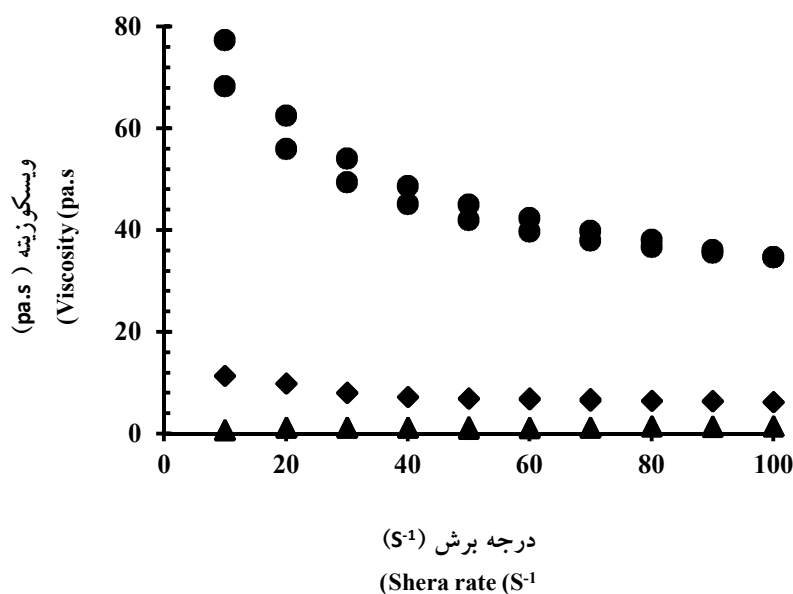
بررسی رفتار جریان سیستم‌های حاوی صمغ کتیرا و ایزوله پروتئین آب‌پنیر: بررسی رفتار جریان محلول پروتئین حرارت دیده، محلول صمغ کتیرا و همچنین کمپلکس (شکل ۳) نشان می‌دهد در حالی که صمغ کتیرا سودوپلاستیک بوده و حلقه هیسترسیس به میزان



شکل ۳- رفتار جریان محلول‌های ۰/۱٪ (▲) ایزوله پروتئین آب‌پنیر حرارت‌دیده، (◆) صمغ کتیرا و (●) کمپلکس پروتئین - صمغ
Figure 3. Flow behavior at 0.1% concentration for: (▲) heat treated WPI, (◆) GT and (●) WPI-GT complex

صمغ هستند. به علاوه در شکل ۴ مشاهده می‌شود که در نمونه‌های کمپلکس بین منحنی‌های رفت و برگشت حلقه هیستریسیس در تمام دامنه درجه برش وجود دارد و با کاهش درجه برش حلقه هیستریسیس بزرگ‌تر می‌شود. علت اصلی تشکیل حلقه هیستریسیس ساختار فاز کمپلکس است که نیاز به زمان دارد تا پس از تغییر شکل دوباره بازسازی شود. این ساختار احتمالاً به دلیل برهم‌کنش‌های الکترواستاتیکی بین صمغ و پروتئین ممکن است در تغییر شکل پلی ساکارید اثرگذار باشد (۳۱). در واقع زمانی که نیروی جاذبه‌ای وجود نداشته باشد امکان دارد رفتار رقیق‌شوندگی مشاهده شود اما حلقه هیستریسیسی ایجاد نشود.

ویسکوزیته محلول‌های توضیح داده شده در شکل ۳ به عنوان تابعی از درجه برش در شکل ۴ 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 (۳۱). به استثنای محلول پروتئین که ویسکوزیته آن با افزایش درجه برش به میزان جزئی افزایش یافته بود، محلول صمغ کتیرا و فاز کمپلکس رفتار رقیق‌شوندگی را نشان دادند. با این تفاوت که رفتار جریان نمونه کمپلکس نسبت به نمونه صمغ کتیرا، سودوپلاستیک تر بود. این امر ثابت می‌کند که صمغ‌ها عامل اصلی رفتار سودوپلاستیک در محلول کمپلکس پروتئین-



شکل ۴- ویسکوزیته محلول‌های ۰/۱٪: (▲) ایزوله پروتئین آب‌پنیر حرارت‌دیده، (◆) صمغ کتیرا و (●) کمپلکس پروتئین - صمغ به عنوان تابعی از درجه برش

Figure 4. Viscosity at 0.1% concentration for: (▲) head treated WPI, (◆) GT and (●) WPI-GT complex

قدم برای بررسی چنین سیستم‌های مایعی، محاسبه جبری غلظت بیوپلیمرها در دو فاز روشن‌آور و رسوب است. غلظت پلی ساکارید موجود در دو فاز را می‌توان با روش‌هایی مثل رفرکتومتری (۲) یا آنالیز تزریق جریان (۱۲) و یا روش فنل سولفوریک اسید

بررسی شرایط تشکیل کمپلکس‌ها بر اساس تعیین مقدار پروتئین و کربوهیدرات در دو فاز: جداسازی فاز در سیستم‌های بیوپلیمری به دلیل کاربردهایی که در صنایع غذایی، تغذیه و دارویی دارند موضوعات پژوهشی مهمی تلقی می‌شوند (۱۰، ۳۰). معمولاً اولین

که متداولترین آنها است مشخص نمود. اساساً 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 تشکیل کمپلکس به عنوان تابعی از زمان حرارت‌دهی پروتئین و نسبت پروتئین به صمغ کتیرا در مخلوط

Table 1. Complexation yield as a function of heating time and Pr:PS ratio in the mixture

فاز روشناور Supernatant		فاز رسوب Precipitation phase			نسبت صمغ:پروتئین Pr:PS	زمان حرارت‌دهی Heating time (min)
صمغ کتیرا (%) Tragacanth gum (%)	پروتئین (%) Protein (%)	صمغ کتیرا (%) tragacanth gum (%)	پروتئین (%) Protein (%)	نسبت صمغ:پروتئین Pr:Ps ratio		
27.08 ± 3.29	15.13 ± 1.24	72.92 ± 3.29	84.87 ± 1.24	1.13 ± 0.01	0.05	15
44.89 ± 5.15	23.01 ± 3.7	55.11 ± 5.15	76.99 ± 3.7	1.28 ± 0.00	0.1	15
36.92 ± 0.63	17.232 ± 0.24	63.08 ± 0.63	82.77 ± 0.24	1.31 ± 0.02	0.2	15
20.39 ± 0.36	12.4 ± 1.52	79.61 ± 0.36	87.6 ± 1.52	1.35 ± 0.03	0.5	15
28.12 ± 1.35	18.63 ± 1.16	71.88 ± 1.35	81.37 ± 1.16	1.43 ± 0.03	1	15
40.51 ± 0.4	14.77 ± 4.97	59.49 ± 0.4	85.23 ± 4.97	2.96 ± 0.22	2	15
27.44 ± 0.79	10.88 ± 0.26	72.56 ± 0.79	89.12 ± 0.26	0.92 ± 0.03	0.05	25
23.17 ± 0.33	10.5 ± 0.77	76.83 ± 0.33	89.5 ± 0.77	0.98 ± 0.00	0.1	25
15.34 ± 1.44	27.1 ± 0.56	84.66 ± 1.44	72.9 ± 0.56	0.99 ± 0.02	0.2	25
23.96 ± 0.48	22.46 ± 0.35	76.043 ± 0.48	77.54 ± 0.35	1.05 ± 0.03	0.5	25
23.87 ± 0.53	13.2 ± 0.83	76.13 ± 0.53	86.8 ± 0.83	1.05 ± 0.02	1	25
11.53 ± 0.5	14.72 ± 1.01	88.47 ± 0.5	85.28 ± 1.01	1.15 ± 0.06	2	25
30.56 ± 0.3	9.74 ± 1.04	69.44 ± 0.3	90.26 ± 1.04	1.09 ± 0.04	0.05	35
52.67 ± 0.22	9.26 ± 0.19	47.33 ± 0.22	90.74 ± 0.19	1.18 ± 0.08	0.1	35
28.91 ± 2	8.38 ± 0.65	71.09 ± 2	91.62 ± 0.65	1.32 ± 0.01	0.2	35
31.48 ± 0.87	7.25 ± 0.07	68.52 ± 0.87	92.75 ± 0.07	1.45 ± 0.04	0.5	35
27.25 ± 2.94	9.24 ± 0.97	72.75 ± 2.94	90.76 ± 0.97	1.61 ± 0.14	1	35
35.78 ± 0.74	8.55 ± 0.3	64.22 ± 0.74	91.45 ± 0.3	1.85 ± 0.29	2	35

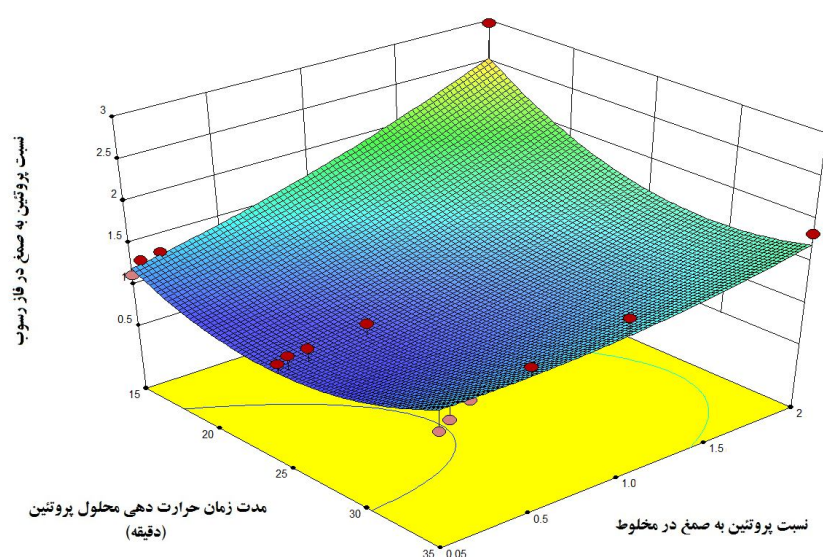
اعداد میانگین ۳ تکرار هستند.

فاز روشناور دیده می‌شود). علت حضور درصد نسبتاً بالای صمغ کتیرا در فاز روشناور حاکی از آن است که پلی‌ساکارید در تشکیل کمپلکس شرکت نکرده و توده‌های پروتئینی تشکیل شده‌اند. لنویل و همکاران (۲۰۰۰) رویداد چنین پدیده‌ای در مورد کمپلکس‌های

جدول ۱ درصد پروتئین و صمغ را در هر دو فاز روشناور و فاز رسوب نشان می‌دهد. به‌طورکلی صمغ کتیرا تحت هر شرایطی در هر دو فاز روشناور و رسوب دیده می‌شود (در بهترین شرایط حدود ۱۱/۵۳٪ و در بدترین شرایط حدود ۵۲/۶۷٪ صمغ در

دی‌متیل دی‌آلیل آمونیم) کلراید نیز گزارش شده است (۳۳، ۳۴). تمامی کمپلکس‌های پروتئین- پلی‌ساکارید از پایداری نسبی بالا و کدورت کمتری نسبت به محلول حرارت دیده پروتئین برخوردار بودند (شکل ۱، ۲)؛ بنابراین فرضیه اول در خصوص تشکیل توده‌های پروتئینی رد می‌شود و دلیل حضور صمغ در فاز روشن‌تر احتمالاً تا حدی تشکیل کمپلکس‌های محلول و برخی دیگر به دلیل حضور صمغ کثیراً به صورت آزاد در محلول است.

گزانتان - پروتئین آب‌پنیر را این گونه توصیف کردند که برهم‌کنش‌های پروتئین - پروتئین بر تشکیل کمپلکس‌های پروتئین - پلی‌ساکارید غلبه دارد و یا این که پروتئین با پلی‌ساکارید اتصال نداده است (۱۳). البته حضور مقادیر بالای صمغ در فاز محلول می‌تواند دلیل دیگری نیز داشته باشد؛ به این معنی که بخشی از صمغ باعث تشکیل کمپلکس‌های محلول صمغ - پروتئین شده است. چنین شرایطی قبلاً برای کمپلکس‌های محلول سرم آلبومین گاوی - پلی



شکل ۵- تغییرات نسبت پروتئین به صمغ موجود در فاز رسوب به‌عنوان تابعی از مدت زمان حرارت‌دهی محلول پروتئین و نسبت پروتئین به صمغ کل

Figure 5. Protein to polysaccharide ratio in precipitation as a function of heating time and total Pr:Ps

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.

در جدول ۱ مشاهده می‌شود که تغییرات نسبت پروتئین به صمغ در مخلوط، اثر معنی‌داری بر میزان بیوپلیمرها در فاز رسوب ندارد ($p > 0.05$). اما با توجه

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. 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 تأیید می‌گردد. از طرفی در مدت زمان‌های کمتر یا بیشتر از ۲۵ دقیقه حرارت‌دهی نسبت پروتئین به صمغ در فاز رسوب

جلوگیری از توده‌های بزرگ پروتئینی و تشکیل کمپلکس‌های پروتئین- پلی ساکارید است که اندازه ذرات و کدورت کمتری نسبت به محلول‌های خالص پروتئین داشتند.

با وجود اینکه رفتار جریان محلول پروتئینی حرارت دیده از نوع نیوتنی بود، اما در مورد صمغ کتیرا و همچنین مخلوط صمغ- پروتئین رفتار سودوپلاستیک مشاهده شد که نشان می‌دهد صمغ کتیرا مسئول اصلی ایجاد رفتار سودوپلاستیک در کمپلکس‌های پروتئین آب‌پنیر- صمغ کتیرا است. به علاوه در منحنی‌های رفت و برگشت نه تنها حلقه هیستریسیس 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 کتیرا و پروتئین آب‌پنیر می‌تواند باشد.

با اندازه‌گیری درصد صمغ و پروتئین آب‌پنیر در فاز روشن‌ور و فاز رسوب مشخص شد که درصد نسبتاً بالایی از صمغ کتیرا در فاز روشن‌ور وجود دارد؛ در حالی که آزمایشات کدورت سنجی ثابت کرد کمپلکس‌های پروتئین- صمغ کتیرا از پایداری بالایی برخوردار هستند. بنابراین علت این امر تا حدی به تشکیل کمپلکس‌های محلول صمغ- پروتئین و بخشی به دلیل حضور صمغ کتیرا به صورت آزاد و پراکنده در فاز روشن‌ور مرتبط است. همچنین مشخص شد کمترین نسبت پروتئین به صمغ در فاز رسوب پس از ۲۵ دقیقه حرارت‌دهی پروتئین حاصل می‌شود. همچنین نسبت پروتئین به صمغ کتیرا در مخلوط اثر چشمگیری بر میزان بیوپلیمر موجود در فاز رسوب نداشت اما تأثیر آن بر نسبت بیوپلیمرها معنی‌دار بود.

به شکل ۵ واضح است که در تمامی زمان‌های حرارت‌دهی، با کاهش نسبت پروتئین به صمغ در مخلوط نسبت پروتئین به صمغ در فاز رسوب نیز کاهش یافته است. بنابراین در کمپلکس‌های صمغ کتیرا- پروتئین آب‌پنیر، محاسبه نسبت پروتئین به صمغ در فاز رسوب پارامتر بهتری جهت تعیین میزان برهم‌کنش پروتئین و پلی ساکارید است. کاهش پروتئین نسبت به صمغ در فاز رسوب به این معنی است که احتمالاً 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.

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش اثر ایزوله پروتئین آب‌پنیر که در زمان‌های متفاوتی تحت اعمال تیمار حرارتی قرار گرفته بود بر ویژگی‌های کمپلکس پروتئین- صمغ کتیرا مورد بررسی قرار گرفت. افزایش زمان حرارت- دهی 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=۴) 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 بیشترین اندازه ذرات پس از ۲۵ دقیقه حرارت‌دهی محلول پروتئین ایجاد می‌شود. با افزودن صمغ کتیرا به محلول‌های پروتئین پایداری قابل ملاحظه‌ای در اثر برهم‌کنش صمغ- پروتئین مشاهده شد که دلیل آن

منابع

- Antonov, A.Y., Dmitrochenko, A.P., and 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.
- Bourriot, S., Garnier, C., and Doublier, J.L. 1999. Phase separation, rheology and structure of micellar casein–galactomannan mixtures. *International Dairy Journal*. 9: 353–357.
- Bourriot, S., Garnier, C., and Doublier, J.L. 1999. Phase separation. Rheology and microstructure of micellar casein–guar gum mixtures. *Food Hydrocolloids*. 13: 43–49.
- Dickinson, E. 1995. Mixed biopolymers at interfaces. P 349–372, In: S.E. Harding, S.E., Hill and J.R. Mitchell (eds), *Mixed Biopolymers*, Nottingham University Press, Nottingham.
- Ercelbi, E.-A. and Ibanoglu, E. 2007. Influence of hydrocolloids on phase separation and emulsion properties of whey protein isolate. *Journal of Food Engineering*. 80: 454–459.
- Firooz, M.H., Mohammadifar, M.A., and Haratian, P. 2012. Self-assembly of β -lactoglobulin and the soluble fraction of gum tragacanth in aqueous medium. *International Journal of Biological Macromolecules*. 50: 925–931.
- Gorji, S.G., Gorji, E.G., and 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.
- Jang, H.D., and Swaisgood, H.E. 1990. Disulfide bond formation between thermally denatured β -lactoglobulin and κ -casein in casein micelles. *Journal of Dairy Science*. 73: 900–904.
- Jones, O.G., Lesmes, U., Dubin, P., and 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.
- 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.
- Kim, H.-J., Decker, A.E., and 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.
- Kontogiorgos, V., Tosh, S.M., and Wood, P.J. 2009. Phase behaviour of high molecular weight oat β -glucan/whey protein isolate binary mixtures. *Food Hydrocolloids*. 23: 949–956.
- Laneuville, S.I., Paquin, P., and Turgeon, S.L. 2000. Effect of preparation conditions on the characteristics of whey protein-xanthan gum complexes. *Food Hydrocolloids*. 14: 305–314.
- Lapasin, R., and Pricl, S. 1999. *Rheology of polysaccharide systems Rheology of industrial polysaccharides: Theory and applications*. United States of America: An Aspen Publication, Pp: 250–309.
- Lazaridou, A., and 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.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193: 265–275.
- Mutilangi, W.R.M., and Kilara, A. 1985. Functional properties of heat denatured whey protein. I. Solubility. *Milchwissenschaft*. 40(6): 338–341.
- Nasirpour, A., Amir, M., Hajhashemi, Z., and Fazilati, M. 2013. Complex formation between Tragacanth gum and beta-lactoglobulin in aqueous solution. *International Food Research Journal*. 20(3):1249–1254.
- Pelegri, D.H.G., and Gomes, M.T.M.S. 2012. Analysis of whey proteins solubility

- at high temperatures. *International Journal of Food Engineering*. 8(3).
20. Perrechil, F.A., Braga, A.L.M., and Cunha, R.L. 2009. Interactions between sodium caseinate and LBG in acidified systems: Rheology and phase behavior. *Food Hydrocolloids*. 23: 2085–2093.
 21. Phillips, G. O. and Williams, P. A. 2009. *Handbook of Hydrocolloids*, Cambridge, UK: Woodhead Publishing Ltd, Pp: 483-496.
 22. Samant, S.K., Singhal, R.S., Kulkarni, P.R., and Rege, D. 1993. Protein–polysaccharide interactions: a new approach in food formulations. *International Journal of Food Science and Technology*. 28(6): 547-562.
 23. Sanchez, C., and Paquin, P. 1997. Protein and protein–polysaccharide microparticles. *Food science and technology*, New York, Marcel Dekker, Pp: 503–528.
 24. Schmitt, C., and Turgeon, S.L. 2011. Protein/polysaccharide complexes and coacervates in food systems. *Advances in Colloid and Interface Science*. 167: 63-70.
 25. Shu, Y.-W., Sahara, S., Nakamura, S. and 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.
 26. Stauffer, K.R. 1980. Gum Tragacanth, P 11-1–11-30, In: R.L. Davidson (ed), *Handbook of water-soluble gums and resins*, New York, McGraw-Hill.
 27. Stauffer, K.R., and Andon, S.A. 1975. Comparison of the functional characteristics of two grades of tragacanth. *Food Technology*. 4: 46-51.
 28. Stone, A.K., and Nickerson, M.T. 2012. Formation and functionality of whey protein isolate (κ -, ι -, and λ -type) carrageenan electrostatic complexes. *Food Hydrocolloid*. 27: 271-277.
 29. Tolstoguzov, V.B. 1996. Structure-property relationships in foods. P 1-14, In: N. Parris, A. Kato, L.K. Creamer and J. Pearce (eds), *Macromolecular interactions in food technology*, ACS Symposium Series 650. Washington, DC: American Chemical Society.
 30. Tolstoguzov, V.B. 2003. Some thermodynamic considerations in food formulation. *Food Hydrocolloids*. 17: 1-23.
 31. Weinbreck, F., Wientjes, R.H.W., Nieuwenhuijse, H., Robijn, G.W., and de Kruif, C.G. 2004. Rheological properties of whey protein/gum arabic coacervates. *Journal of Rheology*. 48: 6.1215-1228.
 32. Weiping, W. 2000. Tragacanth and karaya. P 231-246, In: Philips, G.O., and Williams, P. A. (eds), *Handbook of hydrocolloids*, Cambridge, England: CRC Press.
 33. Xia, J., and Dubin, P.L. 1995. Protein–polyelectrolyte complexes. P 247–274, In: P.L. Dubin, J. Bock, R., Davies, D.N. Schulz and C. Thies (eds), *Macromolecular complexes in chemistry and biology*, Berlin: Springer-Verlag.
 34. Zaitzev, V.S., Izumrudov, V.A., and Zezin, A.B. 1992. A new family of water-soluble protein – polysaccharide complexes. *Polymer Science USSR*. 34(1): 54–55.
 35. Zhang, G., and Foegeding, E.A. 2003. Heat-induced phase behavior of β -lactoglobulin/polysaccharide mixtures. *Food Hydrocolloids*. 17: 785–792.

Effect of thermal treatment of whey protein isolate on the characteristics of tragacanth gum - whey protein isolate complexes

N. Raoufi¹, R. Kadkhodae^{2*}, M. Najaf Najafi³

¹Former Ph.D. Student, Department of Food Nanotechnology, Research Institute of Food Science and Technology (RIFST), Mashhad, Iran

²Associate professor, Department of Food Nanotechnology, Research Institute of Food Science and Technology (RIFST), Mashhad, Iran

³Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Mashhad, Iran

Received: 2016/01/26; Accepted: 2017/10/24

Abstract

Background and objectives: Tragacanth gum (GT) is one of the natural secreted hydrocolloids which has many applications in food and pharmaceutical industries. Unfortunately, there is limited scientific information about the electrostatic interactions of tragacanth gum with proteins, especially the proteins unfolded by physical approaches. In this regard, the main objective of this study was to investigate the effect of thermal processing on the whey protein isolate (WPI) properties and its complexation with tragacanth gum.

Materials and methods: The influence of heating time (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 and 35 min at 80°C) on the turbidity of WPI, alone and mixed with GT ($r = 0.1$, pH 4.0 and Cp 0.1 w/w) was surveyed. Then, the flow behaviour and viscosity of GT -WPI mixture at a shear rate of 0-100 S⁻¹ (pH 4.0) was compared with the individual solutions of gum and protein. Since the maximum turbidity was observed in the range of 15-35°C, the impact of heating time at three levels (15, 25 and 35 min) and biopolymer mixing ratio at six levels (2:1, 1:1, 1:2, 1:5, 1:10 and 1:20) on the protein and carbohydrate compositions of precipitate and supernatant was investigated by Lowry and phenol-sulphuric acid methods, respectively.

Results: Turbidity of protein solutions significantly changed with rising the heating time such that the maximum turbidity achieved after 25 min thermal processing. While these solutions were unstable due to protein-protein interaction and formation of protein aggregates, GT addition led to significant changes in the stability of protein solutions as a result of protein-polysaccharide interactions. Similar to protein solutions, the maximum turbidity of the complexes was achieved after 25min thermal processing. The rheological measurements showed that the mixture solution had pseudoplastic behavior with a large hysteresis loop as well as the higher viscosity rather than the blank solutions, indicating the formation of electrostatic interactions between protein and polysaccharide. By determining protein and polysaccharide content in the supernatant and precipitate phases, the least ratio of Pr:PS was observed for the 25-min heated WPI. Furthermore, the ratio of Pr:PS in the precipitate was increased significantly as Pr:PSratio was increased in the mixture.

Conclusion: Addition of tragacanth gum to the whey protein isolate led to a significant stability in the solution. Due to unfolding of WPI, using thermal processing on the whey protein isolate solution resulted in a meaningful increase in the turbidity of protein solution and the efficiency of GT-WPI complex formation.

Keywords: WPI, Tragacanth gum, Turbidity, Complex, Viscosity

*Corresponding author; r.kadkhodae@rifst.ac.ir