

مقاله پژوهشی

بهینه‌یابی برهمکنش پروتئین آب پنیر-صمغ دانه شاهی به روش سطح پاسخ و بررسی خواص کف‌زایی نمونه بهینه

زهرا خلوصی^۱ - مصطفی مظاهری طهرانی^{۲*} - سید محمدعلی رضوی^۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۲/۲۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۵/۰۲

چکیده

در این پژوهش، ابتدا شرایط تشکیل کمپلکس کواسروات صمغ دانه شاهی - کنسانتره پروتئین آب پنیر مورد مطالعه قرار گرفت. pH و نسبت پروتئین به پلی‌ساکارید بهینه به ترتیب ۴/۲ و ۵ به دست آمد. بدین منظور pH و نسبت کنسانتره پروتئین آب پنیر به صمغ دانه شاهی به ترتیب در دامنه‌های ۲-۷ و ۱:۵ تا ۵:۱ (وزنی/وزنی) به عنوان متغیر مستقل برای به دست آوردن بالاترین عملکرد کمپلکس کواسروات (با آزمون‌های کدورت سنجی و مقدار رسوب) به عنوان متغیرهای پاسخ با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM) و بر مبنای طرح مرکب مرکزی (CCD) بهینه شدند. در ادامه تحقیق، خواص کف‌زایی نمونه بهینه مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد خواص کف‌زایی نمونه بهینه افزایش معنی‌داری را در مقایسه با پروتئین شاهد خالص به دلیل حضور صمغ دانه شاهی و تاثیر بر تشکیل فیلم ویسکوالاستیک و ویسکوزیته فاز توده نشان داد.

واژه‌های کلیدی: بهینه‌یابی، پروتئین آب پنیر، صمغ دانه شاهی، کمپلکس کواسروات، کف زایی

مقدمه

بیوپلیمرهای پروتئین-پلی‌ساکارید و pH مخلوط از عوامل مهم مؤثر در جذب و سازگاری پروتئین-پلی‌ساکارید و همچنین ویژگی‌های تجمع‌های تشکیل شده آنها هستند (Shu et al. 1996)، لذا در پژوهش‌های قبلی این دو پارامتر برای دستیابی به بالاترین عملکرد و کارایی ممکن کمپلکس کواسروات بهینه شده اند. برای این منظور چگالی نوری (کدورت) مخلوط‌های پروتئین-پلی‌ساکارید و بازده رسوبات خشک شده در این مطالعه به عنوان پایه بهینه‌سازی فرآیند کمپلکس کواسروات همانند سایر مطالعات قبلی (Wang et al., 2012) مورد استفاده قرار گرفت. این تجمع‌های ماکرومولکولی، از نوع کواسروات نانو یا ریز ذرات می‌توانند برای ریزپوشانی (انکپسولاسیون) ترکیبات زیست فعال و عوامل عطر و طعم در صنایع غذایی مورد استفاده قرار گیرند (Sanchez et al. 1997; Schmitt et al. 1998). همچنین کواسروات‌ها بسته به شرایط واکنش و نوع بیوپلیمرهای شرکت کننده، حامل ترکیبی از خواص فیزیکیوشیمیایی ماکرومولکول‌های سازنده خود، به ویژه خصوصیت هیدروفوبی و هیدروفیلی آنها هستند که می‌توانند به عنوان مواد تشکیل‌دهنده برای تثبیت هوا- آب یا روغن- آب در انواع سیستم‌های غذایی کمپلکس و در طیف وسیعی از محصولات غذایی از جمله نوشیدنی‌ها، بستنی، نان، کیک، موس، شیرهای همزده، نوشابه، مارشمالو، کیک میوه‌ای، تاپینگ، شکلات‌های هوادار، کف‌های چسبنده گیاهی، دسرهای میوه‌ای منجمد و غیره نقش عامل کف‌زا و یا تثبیت امولسیون‌ها استفاده شوند (Schmitt and Turgeon 2011; Weinbreck et al.

پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها بیوپلیمرهای طبیعی هستند که جزء پرکاربردترین هیدروکلوئیدها در صنایع غذایی می‌باشند (Gaonkar and McPherson 2006) که اغلب در مواد غذایی و محصولات دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Jones et al. 2010). از آنجا که این دو بیوپلیمر معمولاً اثر هم افزایی داشته و ویژگی‌های عملکردی یکدیگر را بهبود می‌بخشند (Harnsilawat et al., 2006)، اغلب به طور همزمان مورد استفاده قرار می‌گیرند، بنابراین آگاهی از فعل و انفعالات بیوپلیمر به دلیل نقش مهم آنها در کنترل پایداری، بافت و ساختار و همچنین جنبه رژیم غذایی محصولات غذایی از اهمیت زیادی برخوردار است (Cavallieri et al., 2011). در تعامل الکترواستاتیک، پروتئین دارای بار مثبت با پلی‌ساکاریدهای حاوی گروه‌های منفی کربوکسیلیک، فسفات یا سولفات در زیر نقطه ایزوالکتریک (PI) (LEE, MORR, and HA 1992) پروتئین، منجر به تشکیل ذرات ماکرومولکول با ایجاد تجمعات ملکولی غنی از پلیمرهای زیستی معلق در فاز آبی، به نام کمپلکس‌های کواسروات شده که باعث انعقاد و جداسازی خود به خودی فاز می‌شوند. نسبت

۱ و ۲- به ترتیب دانش‌آموخته دکتری و استاد، قطب علمی هیدروکلوئیدهای طبیعی بومی ایران، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

* - نویسنده مسئول: (Email: mmtehrani@um.ac.ir)

خصوصیات رئولوژیکی، امولسیون‌کنندگی، کف‌کنندگی مطلوب و همچنین پایداری در گستره وسیعی از حرارت، سرما، نمک و pH با اثرات سینرژیک در حضور قندها (ساکارز، لاکتوز) می‌باشد که این ویژگی‌ها را در تثبیت امولسیون‌ها و کف‌ها حائز اهمیت است. طی بررسی‌های صورت گرفته پایداری بالای صمغ دانه شاهی در طول فرآیندهای مختلف، مربوط به کنفورماسیون زنجیری نیمه سخت و نسبت بالای مانوز به گالاکتوز (۸/۲٪) این صمغ است که آن را برای استفاده در محصولات غذایی با اهداف مختلف و کاهش آثار تخریبی ناشی از فرآیندهای حرارتی مناسب می‌سازد (Behrouzian *et al.*, 2013; Naji *et al.*, 2012; Naji, Razavi and Karazhiyan, 2012; Naji and Razavi, 2014).

هدف کلی از این پژوهش، دستیابی به نقطه بهینه تعامل الکترواستاتیک نسبت‌های مختلف کنسانتره پروتئین آب پنیر با صمغ دانه شاهی در دامنه pH ۲ تا ۷ به روش سطح پاسخ و بررسی خواص کف زایی کمپلکس کواسروات در نقطه بهینه در مقایسه با پروتئین شاهد خالص در همان نسبت می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد اولیه این پژوهش شامل دانه شاهی از عطاری سطح شهر مشهد، کنسانتره پروتئین آب پنیر با خلوص ۸۰٪ از شرکت میلی آلمان و هیدروکلریک اسید با خلوص ۳۷٪ از شرکت مرک تهیه گردید.

استخراج صمغ دانه شاهی

صمغ دانه شاهی از دانه کاملاً بوجاری شده و سالم شاهی در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و pH=۷ درحالی که مخلوط آب مقطر به دانه با نسبت ۱:۳۷ به مدت ۱۸ دقیقه همزده می‌شد استخراج گردید (Karazhiyan *et al.*, 2011). عملیات جداسازی صمغ از دانه متورم شده شاهی توسط اکسترکتور مجهز به صفحه چرخنده (استخراج کننده آزمایشگاهی، پارس خزر، ایران) انجام گرفت. محلول به دست آمده جهت جداسازی دانه‌ها و ذرات جانبی از صافی عبور داده شد و سپس جهت خشک شدن با قرار دادن آن‌ها در ظروف پلاستیکی به آون ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انتقال یافت. صمغ خشک برای استفاده در پژوهش توسط آسیاب آزمایشگاهی پودر و در ظرف دربسته در یخچال نگهداری شد.

تهیه پراکنش‌های صمغ و پروتئین

پودرهای پروتئین و پلی‌ساکارید توسط ترازوی چهار صفر آزمایشگاهی با دقت بالا وزن شدند و به‌طور مجزا با آب مقطر به غلظت ۱٪ (وزنی/وزنی) رسیدند. جهت جلوگیری از رشد میکروارگانیزم‌ها، سدیم آزاید به میزان ۰/۰۲٪ به محلول پروتئینی

(2003). در پژوهش حاضر، بهینه‌یابی شرایط تشکیل کمپلکس کواسروات کنسانتره پروتئین آب پنیر- صمغ دانه شاهی و خواص کف‌زایی کمپلکس کواسروات برای اولین بار مورد مطالعه قرار گرفته است. پروتئین‌های شیر از جمله پروتئین آب پنیر نقطه عطف تحقیقات کلونیدی هستند که در توسعه محصولات غذایی جدید به دلیل خواص تغذیه‌ای منحصر به فرد، خواص کاربردی و تکنولوژیکی، خواص بین سطحی و ژل‌شوندگی آن در نقش امولسیفایرها، ژل‌دهنده‌ها و تثبیت‌کننده‌ها در بسیاری از فرمولاسیون‌های غذایی مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Forschen 2017; Dickinson 1992).

پروتئین‌های آب پنیر، به‌عنوان ماکرومولکول‌های آمفیپاتیک، این توانایی را دارند که در سطح مشترک فازهای پراکنده و پیوسته باز شده و جذب شوند (Scheer *et al.*, 2001; Tamm *et al.* 2012; Wierenga and Gruppen, 2010) و یک لایه جاذب ویسکوالاستیک تشکیل دهند (Wilde, 2000). همچنین پروتئین آب پنیر با توانایی جذب در سطح مشترک آب- روغن و آب- هوا از طریق تعاملات هیدروفوبیکی یا پل‌های دی‌سولفید، و پیوندهای بین مولکولی (Nicorescu *et al.* 2008)، به‌عنوان عوامل کف‌زا عمل کند (Dickinson, 1992; Forschen, Nicorescu *et al.*, 2008) 2017 خصوصیات کف‌زایی یا فعالیت‌های سطحی پروتئین‌ها با خصوصیات فیزیکوشیمیایی آن‌ها مانند ساختار، اندازه، شکل و ترکیب آمینو اسیدها (Patino, 2011) و عوامل محیط خارجی ارتباط نزدیکی دارد.

دانه شاهی با نام علمی *Lepidium sativum* از خانواده شب بویان (*Cruciferea*) و عنوان انگلیسی شاهی باغی^۱، در کشورهای خاورمیانه، اروپا و ایالات متحده رشد کرده و جز محصولات کم مصرف می‌باشد. گیاه شاهی منبع غنی از آلكالوئیدها بوده و استفاده از آن به‌عنوان یک افزودنی غذایی در فرمولاسیون فیبرهای رژیمی به دلیل خصوصیات سلامت بخشی؛ ثابت شده است (Karazhiyan *et al.* 2011). دانه شاهی در آب به سرعت آب جذب کرده و ۶/۵-۱۵٪ مایع موسیلاژی چسبناک و بدون عطر و طعم تولید می‌کند (Karazhiyan *et al.* 2011). صمغ دانه شاهی (CSG^۲) دارای متوسط وزن ملکولی ۵۴۰ کیلو دالتون و شعاع چرخش ۷۵ نانومتر، که کربوهیدرات قسمت عمده ترکیب تشکیل دهنده صمغ دانه شاهی با مقدار حدود (۷۷٪)، مقدار اندکی پروتئین (۲/۴٪) به صورت گلیکوپروتئین یا کمپلکس پروتئین-پلی‌ساکارید و چربی (۱/۸۵٪) می‌باشد. همچنین حضور دو اسید ارونیک (۱۵٪) در این صمغ، بیانگر طبیعت پلی‌الکترولیت و حالت آنیونی آن است (Karazhiyan *et al.*, 2009; Nerkar and Gattan, 2012) به‌طور کلی این صمغ دارای

1 Garden cress

2 Cress seed gum

کواسروات با تعادل جرم محاسبه شد (Espinosa-Andrews *et al.*, 2007).

$$(1) \quad \frac{100}{1} \times \frac{\text{وزن رسوب خشک شده} - \text{وزن کل بیوپلیمر}}{\text{وزن کل بیوپلیمر}} = \text{فراکسیون فاز رسوب}$$

تعیین خواص کف‌زایی نقطه بهینه

ظرفیت کف‌کنندگی و پایداری کف هر یک از محلول پروتئین آب پنیر به‌عنوان شاهد و مخلوط پروتئین: پلی‌ساکارید در نقطه بهینه به‌عنوان تابعی از pH در غلظت کل بیوپلیمر (۰/۳٪ وزنی / وزنی) به روش اشاره شده توسط Adebowale و همکاران (۲۰۰۵) مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور ۵۰ میلی‌لیتر از هر نمونه در استوانه مدرج ریخته و با استفاده از هموژنایزر (T25 Ultra Turrax Digital) به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه هموژنیزه گردید. بعد از ثبت حجم نمونه بعد و قبل از هم زدن، ظرفیت کف‌کنندگی از فرمول زیر محاسبه شد:

$$(2) \quad \frac{\text{حجم محلول اولیه} - \text{حجم کف بعد هموژناسیون}}{\text{حجم محلول اولیه}} \times 100 = \text{درصد توانایی کف زایی}$$

برای تعیین پایداری کف، تغییرات حجم نمونه‌ها در استوانه مدرج در مدت زمان ۳۰ دقیقه بعد از نگهداری ثبت و از فرمول زیر محاسبه شد:

$$(3) \quad \frac{\text{حجم کف بعد از مدت زمان ماندگاری}}{\text{حجم اولیه کف}} \times 100 = \text{درصد پایداری کف}$$

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

در این پژوهش مطابق جدول ۱ از دو متغیر مستقل شامل نسبت بیوپلیمرها در دامنه ۵-۲/۰ (وزنی / وزنی) و pH تعامل با دامنه ۲ تا ۷ بر مبنای متغیرهای پاسخ شامل کدورت و رسوب از روش سطح پاسخ (RSM) و در قالب طرح مرکب مرکزی (CCD) با دو متغیر مستقل در دو سطح و ۵ تکرار در نقطه مرکزی با انتخاب ۲۱ نقطه آزمایشی به‌صورت تصادفی جهت بهینه‌یابی تعامل الکترواستاتیک کنسانتره پروتئین آب پنیر با صمغ دانه شاهی استفاده و نتایج با استفاده از نرم‌افزار دیزاین اکسپرت ویرایش ۱۰ تجزیه تحلیل شد. در این طرح آزمایشی با بررسی منابع صورت گرفته، نقاط حداکثر، میانی و حداقل برای دو متغیر مستقل و نقاط حداکثر برای متغیرهای پاسخ انتخاب شدند. آنالیز آماری در بررسی خواص کف زایی با استفاده از نرم‌افزار مینی‌تب ویرایش ۱۹ انجام شد و از آزمون دانکن برای مقایسه میانگین‌ها در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده گردید.

اضافه شد. محلول پروتئین آب پنیر در دمای محیط به مدت ۱ ساعت و محلول صمغ دانه شاهی به مدت ۲۳ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به‌وسیله همزن مغناطیسی با سرعت ۴۰۰ دور در دقیقه تهیه، و جهت هیدراتاسیون هردو ترکیب به مدت ۲۴ ساعت در یخچال با دمای ۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

تهیه مخلوط پروتئین-پلی‌ساکارید

تهیه مخلوط‌های پروتئین-پلی‌ساکارید در جهت بهینه‌یابی تعامل الکترواستاتیک، نسبت وزنی بیوپلیمرها (۱:۵ تا ۵:۱ وزنی / وزنی) و pH تعامل (۲ تا ۷) به‌عنوان متغیرها مورد بررسی قرار گرفتند. مخلوط‌ها، در نسبت تعیین شده توسط نرم‌افزار و غلظت کل بیوپلیمر ۰/۳٪، از پراکنش شاهد پروتئین و صمغ تهیه و بعد از هم دما شدن با محیط و ۱۵ دقیقه هم خوردن، به وسیله اسید کلریدریک ۰/۱، ۰/۵ و ۱ نرمال در pH مورد نظر تنظیم، و جهت حصول اطمینان کامل، عمل هم‌زدن به مدت ۵ دقیقه در هر pH با همزن مغناطیسی با سرعت ۴۰۰ دور در دقیقه انجام شد.

کدورت‌سنجی

چگالی نوری (OD^۱) مخلوط‌های پروتئین: پلی‌ساکارید به‌عنوان تابعی از pH و نسبت در غلظت کل بیوپلیمر ۰/۳٪ توسط اسپکتروفتومتری نوری مرئی-فراپنفش (یونیکو، S-2150، آمریکا) ارزیابی شد. برای اندازه‌گیری چگالی نوری، نمونه‌ها با حجم ۳ میلی‌لیتر در pH مورد نظر در داخل کووت‌های کوارتزی با طول عبور نور ۱ سانتی‌متر قرار گرفت و چگالی نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر ثبت شد. در تمامی نمونه‌ها از آب مقطر به‌عنوان نمونه شاهد استفاده شد (Espinosa-Andrews *et al.*, 2007, Raoufi *et al.*, 2016, Timilsena *et al.*, 2015).

اندازه‌گیری عملکرد کمپلکس کواسروات با اندازه‌گیری

رسوبات

به‌منظور بهینه‌سازی فرآیند کمپلکس کواسروات، عملکرد کواسروات حاصل از اثر متقابل کنسانتره پروتئین آب پنیر و صمغ دانه شاهی به‌عنوان تابعی از pH و نسبت پروتئین به صمغ، با اندازه‌گیری فاز رسوب بررسی شد. محلول‌ها پس از تنظیم pH، به‌منظور تثبیت واکنش، به مدت ۲ ساعت در دمای محیط نگهداری شده و سپس جهت جداسازی فاز رسوب از فاز شناور با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ (Hettich EBA 20 centrifuge) شدند. فاز رسوب به مدت ۱۵ ساعت در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد تا رسیدن به وزن ثابت خشک شد. با استفاده از معادله زیر، عملکرد

جدول ۱- متغیرهای مستقل و سطوح مورد استفاده در سطح طرح پاسخ

کد و سطوح مربوطه			واحد	متغیرها
+۱	۰	-۱		
۵	۲/۶	۰/۲	گرم	نسبت بیوپلیمرها (A)
۷	۴/۵	۲	میلی‌ولت	pH تعامل (B)

جدول ۲- طرح مرکب مرکزی پیشنهادی توسط نرم‌افزار دیزاین اکسپرت برای متغیرهای مستقل تحقیق

ردیف	اجرا	نسبت پروتئین: پلی‌ساکارید (وزنی/وزنی)	pH
۱	۱۳	۰/۲	۲
۲	۴	۰/۲	۲
۳	۱۲	۵	۲
۴	۶	۵	۲
۵	۱۴	۰/۲	۷
۶	۹	۰/۲	۷
۷	۱۷	۵	۷
۸	۱۸	۵	۷
۹	۱۵	۰/۲	۴/۵
۱۰	۱۶	۰/۲	۴/۵
۱۱	۳	۵	۴/۵
۱۲	۵	۵	۴/۵
۱۳	۲	۲/۶	۲
۱۴	۲۱	۲/۶	۲
۱۵	۲۰	۲/۶	۷
۱۶	۱	۲/۶	۷
۱۷	۸	۲/۶	۴/۵
۱۸	۷	۲/۶	۴/۵
۱۹	۱۹	۲/۶	۴/۵
۲۰	۱۱	۲/۶	۴/۵
۲۱	۱۰	۲/۶	۴/۵

نتایج و بحث

آنالیز واریانس و برازش مدل

نتایج آنالیز واریانس در جدول شماره ۳ آورده شده است. بر اساس نتایج به‌دست آمده از آنالیز مقدار P، بهترین مدل برای برازش نتایج آزمون، مدل درجه دوم می‌باشد. همانطور که در جدول مشاهده می‌شود مدل درجه دوم برای هر دو متغیر پاسخ بسیار معنی‌دار ($p < 0.01$) شده است. در جدول شماره ۴ نتایج آنالیز واریانس و ضرایب رگرسیون مدل درجه دوم برای پاسخ‌ها، و همچنین پیش‌بینی نتایج آزمایشگاهی بر اساس شاخص‌های مقدار P، مقدار F، ضریب

تبیین (R^2)، ضریب تبیین اصلاح شده ($R^2_{adjusted}$)، عدم برازش^۱ و ضریب تغییرات (C.V.)^۲ آورده شده است. طبق نتایج مشاهده می‌شود که ضریب تبیین برای پاسخ کدورت و مقدار رسوب به ترتیب ۰/۹۹۴۵ و ۰/۹۸۵۷ حاصل شده است، که نشان‌دهنده مورد اعتماد بودن مدل درجه دوم برای برازش نتایج آزمایشگاهی می‌باشد. از ضریب تبیین اصلاح شده جهت تایید نهایی مدل برازش یافته استفاده شد که به ترتیب برای پاسخ کدورت و مقدار رسوب، ۰/۹۹۶۱ و ۰/۹۸۹۳ به‌دست آمد. ضریب تغییرات (CV) که میزان پراکنش داده‌ها را مشخص می‌کند برای هر دو پاسخ در حد نرمال بوده و به ترتیب برای

1 Lack of fit

2 Coefficient of variation

کدورت و مقدار رسوب، ۳/۶۷ و ۶/۳۳ به دست آمد. فاکتور عدم برازش چهارمین پارامتری است که مورد بررسی قرار گرفت که عدم معنی‌دار بودن این شاخص نشان از برازش صحیح نتایج بر روی مدل مورد

نظر می‌باشد. که در تحقیق انجام شده برای هر دو پاسخ، فاکتور عدم برازش بی معنی بوده است.

جدول ۳- آنالیز واریانس مدل‌های برازش یافته بر متغیرهای پاسخ

مقدار رسوب					کدورت					پاسخ
P	F	میانگین مربعات	مجموع مربعات	درجه آزادی	P	F	میانگین مربعات	مجموع مربعات	درجه آزادی	
-	-	۴۹۷/۳۷	۴۹۷/۳۷	۱	-	-	۴۱۸۲۰/۱۱	۴۱۸۲۰/۱۱	۱	میانگین
۰/۲۴۱۴	۱/۵۴	۹/۷۱	۱۹/۴۱	۲	۰/۶۸۶۶	۰/۳۸	۲۲۳/۹۲	۴۴۷/۸۳	۲	خطی
۰/۴۲۱۷	۰/۶۸	۴/۳۵	۴/۳۵	۱	۰/۹۳۰۲	۰/۰۰۷۹۴	۴/۹۲	۴/۹۲	۱	خطی تعمیم یافته
<۰/۰۰۰۱	۵۶۷/۶۹	۵۳/۸۵	۱۰۷/۷۰	۲	<۰/۰۰۰۱	۱۵۶۳/۷۲	۴۶۳۱/۲۴	۹۲۶۲/۴۷	۲	درجه دو
۰/۵۶۱۷	۰/۶۰	۰/۰۶۰	۰/۱۲	۲	۰/۲۱۴۰	۱/۷۸	۴/۷۱	۹/۴۱	۲	درجه سه
-	-	۰/۱۰	۱/۳۰	۱۳	-	-	۲/۶۴	۲۹/۰۹	۱۱	باقیمانده
-	-	۳۰/۰۱	۶۳۰/۲۶	۲۱	-	-	۲۷۱۴/۴۱	۵۱۵۷۳/۸۴	۱۹	کل

جدول ۴- نتایج تجزیه واریانس و ضرایب رگرسیون مدل چند جمله‌ای درجه دوم برای متغیرهای پاسخ

رسوب					کدورت					منابع-پاسخ
مقدار P	مقدار F	میانگین مربعات	مجموع مربعات	درجه آزادی	مقدار P	مقدار F	میانگین مربعات	مجموع مربعات	درجه آزادی	
<۰/۰۰۰۱	۲۷۷/۱۹	۲۶/۲۹	۱۳۱/۴۶	۵	<۰/۰۰۰۱	۶۵۶/۰۶	۱۹۴۳/۰۴	۹۷۱۵/۲۲	۵	مدل
<۰/۰۰۰۱	۶۹/۵۹	۶/۶۰	۶/۶۰	۱	۰/۱۹۲۵	۱/۸۹	۵/۶۰	۵/۶۰	۱	خطی A
<۰/۰۰۰۱	۱۳۵/۰۸	۱۲/۸۱	۱۲/۸۱	۱	<۰/۰۰۰۱	۴۰/۹۷	۱۲۱/۳۳	۱۲۱/۳۳	۱	B
<۰/۰۰۰۱	۴۵/۸۷	۴/۳۵	۴/۳۵	۱	۰/۲۱۹۹	۱/۶۶	۴/۹۲	۴/۹۲	۱	اثر متقابل A-B
<۰/۰۰۰۱	۳۲/۰۶	۳/۰۴	۳/۰۴	۱	۰/۰۰۰۹	۱۸/۳۰	۵۴/۲۱	۵۴/۲۱	۱	درجه دو A ²
<۰/۰۰۰۱	۱۱۳۱	۱۰۷/۳۷	۱۰۷/۳۷	۱	<۰/۰۰۰۱	۲۷۷۶/۲۸	۸۲۲۲/۴۶	۸۲۲۲/۴۶	۱	B ²
-	-	۰/۰۹۵	۱/۴۲	۱۵	-	-	۲/۹۶	۳۸/۵۰	۱۳	باقیمانده
۰/۷۶۶۰	۰/۳۸	۰/۰۴۲	۰/۱۲	۳	۰/۲۱۴۰	۱/۷۸	۴/۷۱	۹/۴۱	۲	عدم برازش
-	-	۰/۱۱	۱/۳۰	۱۲	-	-	۲/۶۴	۲۹/۰۹	۱۱	خطای خالص
-	-	-	۱۳۲/۸۹	۲۰	-	-	-	۹۷۵۳/۷۳	۱۸	کل
		۰/۹۸۵۷					۰/۹۹۴۵			ضریب تبیین (R ²)
		۰/۹۸۹۳					۰/۹۹۶۱			ضریب تبیین اصلاح شده
		۶/۳۳					۳/۶۷			ضریب تغییرات (C.V. %)

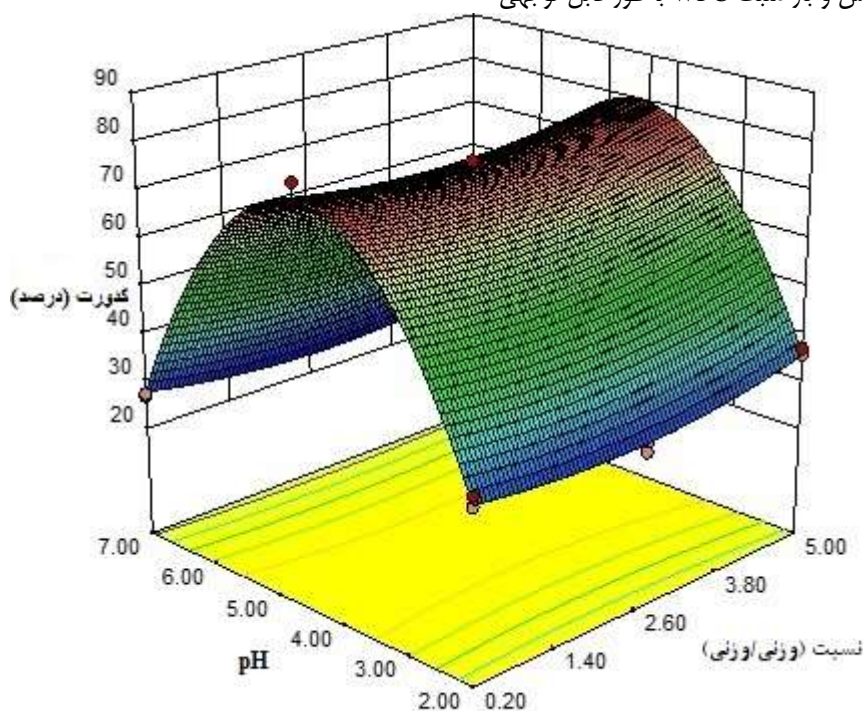
کدورت

نتایج حاصل از آنالیز رگرسیون مدل بر پاسخ کدورت نشان داد که اثر خطی نسبت پروتئین به پلی‌ساکارید، روی کدورت بی‌معنی بوده اما اثر خطی pH معنی‌دار ($p < 0.01$) است. اما در مورد اثر متقابل دو متغیر بر کدورت بی‌معنی بود و اثر درجه دو نسبت معنی‌دار ($p < 0.05$) و اثر درجه دو pH معنی‌دار به دست آمد. اما در نهایت مدل پیشگویی کدورت به عنوان تابعی از متغیرهای مستقل نسبت دو بیوپلیمر و pH به صورت معادله ذیل به دست آمد.

$$Y = 75.4 + 0.79 A - 3.18 B - 0.78 AB - 48.09 B^2 + 3.74 A^2 \quad (1)$$

در شکل ۱ تغییرات کدورت در مقابل متغیرهای مستقل نسبت دو بیوپلیمر و pH نشان داده شده است. همانطور که از نمودار سه بعدی مشخص است دامنه کدورت در این تحقیق ۲۵/۳۳ تا ۸۱/۷۶ به دست آمده است. مطابق نمودار با کاهش pH از حدود ۴/۵ تا ۲، کدورت کاهش پیدا کرده است که علت آن می‌تواند کاهش pH به زیر نقطه ایزوالکتریک پروتئین (۴/۵-۵) (LEE, MORR, and HA 1992) و شروع شکسته شدن انواع کمپلکس و پیوندها باشد. زیرا در این دامنه از pH، بار منفی CSG کاهش و بار مثبت WPC به‌طور قابل توجهی

رو به افزایش می‌رود، از این رو، ممکن است تنها تعدادی مجتمع‌های محلول تشکیل شود که حاصل اتصال توده‌های پروتئینی و تقابل الکترواستاتیک باقی مانده از کربوکسیلیک اسید حاوی بار الکتریکی بالا باشند (Stone and Nickerson 2012) و یا در واقع ممکن است هیچگونه کمپلکس وجود نداشته باشد (Vinayahan, Williams, and Phillips 2010). از طرف دیگر هرچه قدر از pH ۵ به سمت ۷ حرکت می‌کنیم نیز با کاهش کدورت مواجه می‌شویم. این ناسازگاری ترمودینامیکی به دلیل دافع الکترواستاتیک قوی بین صمغ دانه شاهی و ملکول‌های پروتئین هم بار در این دامنه pH است که با ممانعت از اتصال، موجب حل‌پذیری بیوپلیمرها و در نتیجه آن کاهش کدورت شد (Salminen and Weiss 2014). مطابق شکل ۱، روند تغییر کدورت در مقابل نسبت اختلاط پروتئین-پلی‌ساکارید متغیر بود، اما بالاترین کدورت در نسبت ۵:۱ در مقایسه با سایر نسبت‌ها حاصل شد که علت آن کاهش در تعداد حضور گروه‌های کربوکسیلیک باند نشده و به تناسب کاهش دافعه بیوپلیمرها به دلیل حضور کمتر صمغ دانه شاهی دانست که با تشکیل کمپلکس قوی‌تر، کدورت بیشتری حاصل می‌شود (Stone and Nickerson 2012).



شکل ۱- نمودار سه بعدی تغییرات کدورت در مقابل نسبت پروتئین به پلی‌ساکارید و pH

روی مقدار رسوب معنی‌دار ($p < 0.01$) می‌باشد. در مورد اثر متقابل دو متغیر و اثرات درجه دو بر روی مقدار نیز معنی‌دار ($p < 0.01$) گزارش

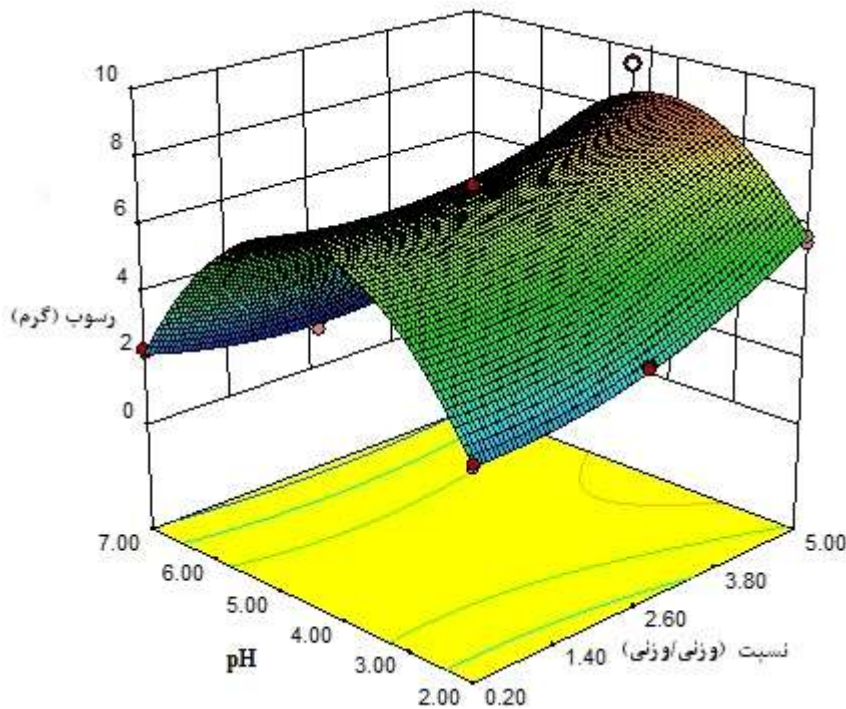
مقدار رسوب

نتایج حاصل از آنالیز رگرسیون مدل بر روی پاسخ کدورت (جدول ۴) نشان داد که اثر خطی نسبت پروتئین به پلی‌ساکارید و pH بر

شده است. اما در نهایت مدل پیشگویی مقدار رسوب به‌عنوان تابعی از متغیرهای مستقل نسبت و pH به‌صورت معادله ۲ به‌دست آمد.

$$Y = 7.09 + 0.74 A - 1.03 B - 0.74 AB + 0.79 B^2 - 4.69 A^2 \quad (2)$$

همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود تغییرات مقدار رسوب در مقابل متغیرهای مستقل نسبت پروتئین به پلی‌ساکارید و pH آورده شده است. با توجه به نمودار، و مطابق پژوهش (Raoufi et al. 2016)، به‌ترتیب با کاهش و افزایش pH از ۴/۵ به ۲ و ۷، به دلیل کاهش در کمپلکس بین دو بیوپلیمر، کاهش در مقدار رسوب‌گذاری اتفاق می‌افتد. علاوه بر این در pHهای پایین به دلیل پروتون‌سازی گروه‌های کربوکسیلیک پلی‌ساکارید و در pHهای بالاتر از ۵ به دلیل دوری از ایزوالکتریک پروتئین (۴/۵-۵) (Oduse et al. 2018; Hasanvand, Rafe, and Emadzadeh 2018)



شکل ۲- نمودار سه بعدی تغییرات مقدار رسوب (درصد) در مقابل متغیرهای مستقل نسبت پروتئین به پلی‌ساکارید و pH

تهیه امولسیون، با بیشترین میزان رسوب حاصل از تعامل الکترواستاتیک قوی در نسبت ۱:۶ و pH=۲/۷ مشاهده شد.

بهینه‌یابی و اعتبارسنجی

شرایط بهینه استخراج جهت دستیابی به حداکثر کدورت و مقدار رسوب با استفاده از روش سطح پاسخ، با درجه مطلوبیت ۰/۹۳۸ نقاط بهینه تعیین شد. نتایج پیشنهاد شده توسط نرم‌افزار در جدول ۵ آورده شده است. نقاط پیش‌بینی شده در آزمایشگاه با ۳ تکرار مورد آزمون

Lv و همکاران (۲۰۱۲) بهینه مخلوط پروتئین ژلاتین: صمغ عربی برای تهیه میکروکپسولاسیون را در نسبت ۱:۱ و pH=۴/۱ با بیشترین رسوب به‌دست آورد. رئوفی و همکاران (۲۰۱۶) از تعامل الکترواستاتیک ایزوله پروتئین آب پنیر و صمغ تراگاکانت با هدف بررسی اثر وزن ملکولی بر نقطه بهینه کواسروات جهت استفاده در صنعت غذایی و دارویی بیشترین رسوب حاصل از نقطه بهینه تعامل را در نسبت ۲:۱ و pH=۳/۴ گزارش کردند. در تحقیق Timilsena و همکاران (۲۰۱۶) بهینه تعامل ایزوله پروتئین چیا با صمغ چیا با هدف

آماری مورد اعتماد می‌باشد. در نقطه بهینه با توجه به متغیرهای مستقل نسبت پروتئین به پلی‌ساکارید و pH که هر کدام به ترتیب ۵ و ۴/۲ اعلام شده است متغیرهای پاسخ کدورت و ته‌نشینی در این نقاط به ترتیب ۸/۷۵ و ۷۹/۸۳ تعیین شد.

قرار گرفت. با انجام آزمون t تست مشخص شد که اختلاف معناداری بین پیش‌بینی نرم‌افزار و نتایج آزمایشگاهی وجود ندارد. با توجه به نتایج به دست آمده و آنالیز آماری می‌توان ادعا کرد نتایج به دست آمده بر روی مدل انتخاب شده بخوبی برازش شده‌اند و نتایج حاصل از نظر

جدول ۵- کمیته و بیشینه پاسخ‌های به دست آمده بر اساس طرح سطح پاسخ بهینه‌یابی

ردیف	عنوان آزمون	مقدار کمیته	مقدار بیشینه	مقدار بیش‌بینی شده			
				مقدار واقعی به دست آمده	تکرار ۱	تکرار ۲	تکرار ۳
۱	کدورت	۲۵/۳۳	۸۱/۷۶	۷۹/۸۳	۸۰/۲۳	۷۸/۹۸	۸۰/۱
۲	مقدار رسوب	۱/۲	۹/۵	۸/۷۵	۸/۵	۸/۷	۹/۱

مرز مشترک آب/ هوا و افزایش ویسکوزیته فاز آبی که زهکشی را با مشکل رو به رو می‌کند دانست (Carp et al., 1999).

پایداری کف

پایداری کف مربوط به درجه از هم پاشیدگی کف در مدت زمان معین شده است (Stone and Nickerson, 2012). در این پژوهش پایداری کف‌ها با اندازه‌گیری حجم ثانویه بعد از تشکیل کف اولیه در مدت زمان ۳۰ دقیقه محاسبه شد. پروتئین‌ها، به‌عنوان ماکرومولکول‌های آمفیپاتیک، به دلیل توانایی در کاهش کشش بین سطحی و ایجاد فیلم چسبناک در مرز مشترک هوا- آب برای تثبیت کف‌ها مزایای بیشتری نسبت به سورفکتانت‌های با وزن مولکولی کم دارند (Borcherdin et al 2008; Wilde 2000; Tamm et al. 2010; Wierenga and Gruppen 2012). همچنین پلی‌ساکاریدها با افزایش ضخامت مایع بین سطحی مشترک حباب‌های هوا (لاملار^۲) همراه با کاهش زهکشی، باعث پایداری کف‌ها می‌شوند. ولی به دلیل خاصیت آبدوست بودن، قابلیت جذب زیادی در مرز مشترک هوا- آب را ندارند، در حالی که برای ایجاد پایداری بهتر در کف‌ها، تشکیل یک فیلم بین سطحی ضخیم ویسکوالاستیک مورد نیاز است. لذا می‌توان گفت پروتئین و پلی‌ساکاریدها در کنار یکدیگر باعث افزایش و بهبود پایداری در کف‌ها می‌شوند (Carp et al, 1999). به‌طور میانگین مقدار پایداری کف‌های پروتئین در این پژوهش از نظر آماری به شکل معناداری ($P < 0.05$) همانند سایر پژوهش‌ها (Stone et al., 2015; Wang et al, 2015; Carp, Bartholomai and Pilosof, 1999; Liu et al., 2010; Makri and Doxastakis, 2007; Stone et al., 2013) تحت تأثیر افزودن صمغ، از $1/414 \pm 0.59/48$ درصد نمونه شاهد (WPC) به $1/414 \pm 0.75/38$ درصد نمونه کمپلکس بهینه (WPC:CSG) افزایش یافت. طی بررسی‌های انجام شده پایداری کف در اثر افزودن

خصوصیات کف‌زایی کمپلکس کوآسروات در نقطه بهینه ظرفیت کف‌زایی

ظرفیت کف‌زایی، عبارت است از مقدار کفی که هر مقدار پروتئین (یا کمپلکس) می‌تواند پس از همگن‌سازی تولید کند (Stone et al., 2014). توانایی در شکل‌گیری و تثبیت کف‌ها یک ویژگی مهم عملکردی پروتئین‌ها است و به ساختار، باقی مانده‌های آبگریز و آبدوست، ثبات کنفورماسیونی و تقابل، تغییر مجدد در مرز مشترک آب، روغن/ هوا و شرایط آزمایشگاهی مورد استفاده بستگی دارد (Stone et al. 2015). در حین تشکیل کف، پروتئین‌ها با کمپلکس‌های پلی‌ساکارید- پروتئین به گونه‌ای که گروه‌های آبگریز به سمت فاز غیرقطبی و گروه‌های آبدوست به سمت فاز قطبی قرار بگیرد، به مرز مشترک آب- هوا مهاجرت و رسوب کرده تا یک فیلم ویسکوالاستیک اطراف حباب گاز تشکیل شود (Stone et al., 2014). ظرفیت کف‌زایی و پایداری کف در سیستم مخلوط بهینه (پروتئین آب پنیر: صمغ دانه شاهی) همراه با محلول‌های پروتئین خالص (به‌عنوان شاهد) در نسبت ۵ به‌عنوان تابعی از pH ۴/۲ با اندازه‌گیری حجم افزوده شده به سیستم محلول بعد از عمل هم‌زدن در سرعت و زمان معین مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش همانند مطالعاتی که Makri و همکاران (۲۰۰۵) و Carp و همکاران (۱۹۹۹)، انجام دادند که در اثر افزودن صمغ زانتان بر پروتئین‌های ایزوله لوبین^۱، نخود فرنگی، لوبیا و پروتئین سویا، افزودن صمغ شاهی به پروتئین آب پنیر به‌طور قابل توجهی ($P < 0.001$) موجب بهبود خاصیت کف‌زایی از پروتئین‌های خالص شاهد با میانگین $1/414 \pm 0.70/110$ به کمپلکس بهینه با میانگین $1/414 \pm 0.70/176$ شد. اما به‌طور کلی طی بررسی‌های انجام شده در دیگر پژوهش‌ها علت افزایش کف‌زایی در کمپلکس‌ها را می‌توان به تأثیر صمغ بر افزایش حجم کف، کاهش فروپاشی حباب، بهبود جذب پروتئین در

پاسخ‌هایی مورد مطالعه (کدورت و درصد رسوب) تاثیر گذاشته است، اگرچه بیشترین اثر را pH داشته است. شرایط بهینه برای تشکیل حداکثر کمپلکس کواسروات پروتئین-پلی‌ساکارید در نسبت پروتئین به پلی‌ساکارید ۵:۱ (وزنی/ وزنی) و pH ۴/۲۴ به دست آمد. نتایج بررسی خواص کف‌زایی در نقطه بهینه افزایش در ظرفیت کف‌زایی و پایداری کف را در مقایسه با پروتئین خالص (نمونه شاهد) نشان داد. این افزایش در خواص کف‌زایی احتمالاً نتیجه حضور صمغ دانه شاهی و تاثیر آن بر تشکیل فیلم ضخیم ویسکوالاستیک، بهبود جذب پروتئین در سطح مشترک و افزایش ویسکوزیته فاز توده بوده است.

پلی‌ساکاریدها و تشکیل کمپلکس از طریق جذب بهتر در مرز مشترک آب-هوا و تشکیل یک فیلم ویسکوالاستیک بین حباب‌های هوای مجاور هم (Makri and Doxastakis, 2007) و همچنین نیروهای چسباننده قابل توجه در بین بیوپلیمرها که از طریق افزایش ویسکوزیته فاز توده حاصل شده است (Martinez et al., 2007; Makri and Dickinson, 2003 Schmitt et al., 1998) Doxastakis, 2007; مبوط می‌شود.

نتیجه‌گیری

نتایج مدل‌سازی با روش سطح پاسخ نشان داد متغیرهای مستقل (نسبت پروتئین آب پنیر به صمغ دانه شاهی و pH) در این تحقیق بر

منابع

- Adebowale, Y. A., I. A. Adeyemi, and A. A. Oshodi. 2005. "Functional and Physicochemical Properties of Flours of Six Mucuna Species." *African Journal of Biotechnology* 4 (12): 1461–68. <https://doi.org/10.5897/AJB2005.000-3223>.
- Behrouzian, Fataneh, Seyed M.A. Razavi, and Hojjat Karazhiyan. 2013. "The Effect of PH, Salts and Sugars on the Rheological Properties of Cress Seed (*Lepidium Sativum*) Gum." *International Journal of Food Science and Technology* 48 (12): 2506–13.
- Carp, D. J., G. B. Bartholomai, and A. M.R. Pilosof. 1999. "Electrophoretic Studies for Determining Soy Proteins-Xanthan Gum Interactions in Foams." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 12 (3–6): 309–16.
- Cavallieri, Angelo L.F., Natalia Amanda Vieira Fialho, and Rosiane L. Cunha. 2011. "Sodium Caseinate and κ -Carrageenan Interactions in Acid Gels: Effect of Polysaccharide Dissolution Temperature and Sucrose Addition." *International Journal of Food Properties* 14 (2): 251–63.
- Dickinson, Eric. 1992. "Structure and Composition of Adsorbed Protein Layers and the Relationship to Emulsion Stability" 88 (20): 2973–83.
- E. Makri, E. Papalamprou, G. Doxastakis* Laboratory. 2005. "Study of Functional Properties of Seed Storage Proteins from Indigenous European Legume Crops (Lupin, Pea, Broad Bean) in Admixture with Polysaccharides." *Food Hydrocolloids* 19 (3): 583–94.
- Espinosa-Andrews, Hugo, Juan G. Báez-González, Francisco Cruz-Sosa, and E. Jaime Vernon-Carter. 2007. "Gum Arabic-Chitosan Complex Coacervation." *Biomacromolecules* 8 (4): 1313–18.
- Forschen, Sci. 2017. "Sci Forschen Nutrition and Food Technology : Open Access Relation with Interfacial Properties."
- Gaonkar, Anilkumar G., and Andrew McPherson. 2006. "Ingredient Interactions Effects on Food Quality," 573.
- Harnsilawat, Thepkunya, Rungnaphar Pongsawatmanit, and D. J. McClements. 2006. "Characterization of β -Lactoglobulin-Sodium Alginate Interactions in Aqueous Solutions: A Calorimetry, Light Scattering, Electrophoretic Mobility and Solubility Study." *Food Hydrocolloids* 20 (5): 577–85.
- Hasanvand, Elham, Ali Rafe, and Bahareh Emadzadeh. 2018. *Phase Separation Behavior of Flaxseed Gum and Rice Bran Protein Complex Coacervates*. Food Hydrocolloids. Vol. 82. Elsevier Ltd.
- Huang, Guo Qing, Yan Ting Sun, Jun Xia Xiao, and Jian Yang. 2012. "Complex Coacervation of Soybean Protein Isolate and Chitosan." *Food Chemistry* 135 (2): 534–39.
- J.M.R.Patino, Ana M.R. Pilosof. 2011. "Protein-Polysaccharide Interactions at Fluid Interfaces." *Food Hydrocolloids* 25 (8): 1925–37.
- Jones, Owen G., Uri Lesmes, Paul Dubin, and David Julian McClements. 2010. "Effect of Polysaccharide Charge on Formation and Properties of Biopolymer Nanoparticles Created by Heat Treatment of β -Lactoglobulin-Pectin Complexes." *Food Hydrocolloids* 24 (4): 374–83.
- K. Borchering1, P.Chr. Lorenzen?, W. Hoffmann, K. Schrader, and Max. 2008. "Effect of Foaming Temperature and Varying Time/Temperature-Conditions of Pre-Heating on the Foaming Properties of Skimmed Milk." *International Dairy Journal* 18 (4): 349–58.
- Karazhiyan, Hojjat, Seyed M.A. Razavi, Glyn O. Phillips, Yapeng Fang, Saphwan Al-Assaf, and Katsuyoshi Nishinari. 2011. "Physicochemical Aspects of Hydrocolloid Extract from the Seeds of *Lepidium Sativum*." *International Journal of Food Science and Technology* 46 (5): 1066–72.
- Karazhiyan, Hojjat, Seyed M.A. Razavi, Glyn O. Phillips, Yapeng Fang, Saphwan Al-Assaf, Katsuyoshi Nishinari, and Reza Farhoosh. 2009. "Rheological Properties of *Lepidium Sativum* Seed Extract as a Function of Concentration,

- Temperature and Time.” *Food Hydrocolloids* 23 (8): 2062–68.
- LEE, SHIH-YOUNG -Y, CHARLES V. MORR, and EWAN Y.W. HA. 1992. “Structural and Functional Properties of Caseinate and Whey Protein Isolate as Affected by Temperature and PH.” *Journal of Food Science* 57 (5): 1210–29.
- Liu, S., C. Elmer, N. H. Low, and M. T. Nickerson. 2010. “Effect of PH on the Functional Behaviour of Pea Protein Isolate-Gum Arabic Complexes.” *Food Research International* 43 (2): 489–95.
- LV, Yi, Xiaoming Zhang, Shabbar Abbas, and Eric Karangwa. 2012. “Simplified Optimization for Microcapsule Preparation by Complex Coacervation Based on the Correlation between Coacervates and the Corresponding Microcapsule.” *Journal of Food Engineering* 111 (2): 225–33.
- Makri, Eleousa A., and Georgios I. Doxastakis. 2007. “Surface Tension of Phaseolus Vulgaris and Coccineus Proteins and Effect of Polysaccharides on Their Foaming Properties.” *Food Chemistry* 101 (1): 37–48.
- Martinez, Karina D., Cecilio Carrera Sanchez, Victor Pizones Ruiz-Henestrosa, Juan M. Rodríguez Patino, and Ana M.R. Pilosof. 2007. “Soy Protein-Polysaccharides Interactions at the Air-Water Interface.” *Food Hydrocolloids* 21 (5–6): 804–12.
- Naji, Sara, Seyed M.A. Razavi, and Hojjat Karazhiyan. 2012. “Effect of Thermal Treatments on Functional Properties of Cress Seed (*Lepidium Sativum*) and Xanthan Gums: A Comparative Study.” *Food Hydrocolloids* 28 (1): 75–81.
- Naji, Sara, Seyed M.A. Razavi, Hojjat Karazhiyan, and Arash Koocheki. 2012. “Influence of Thermal Treatments on Textural Characteristics of Cress Seed (*Lepidium Sativum*) Gum Gel.” *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry* 11 (3): 222–37.
- Naji, Sara, and Seyed M.A. Razavin. 2014. “Functional and Textural Characteristics of Cress Seed (*Lepidium Sativum*) Gum and Xanthan Gum: Effect of Refrigeration Condition.” *Food Bioscience* 5: 1–8.
- Nerkar, Pankaj Padmakar, and Surendra Ganeshlal Gattan. 2012. “Cress Seed Mucilage Based Buccal Mucoadhesive Gel of Venlafaxine: In Vivo, in Vitro Evaluation.” *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 23 (3): 771–79.
- Nicorescu, I., C. Loisel, C. Vial, A. Riaublanc, G. Djelveh, G. Cuvelier, and J. Legrand. 2008. “Combined Effect of Dynamic Heat Treatment and Ionic Strength on Denaturation and Aggregation of Whey Proteins - Part I.” *Food Research International* 41 (7): 707–13.
- Oduse, Kayode, Lydia Campbell, Julien Lonchamp, and Stephen R. Euston. 2018. “Electrostatic Complexes of Whey Protein and Pectin as Foaming and Emulsifying Agents.” *International Journal of Food Properties* 20 (3): S3027–41.
- Raoufi, Nassim, Rassoul Kadkhodae, Glyn O. Phillips, Yapeng Fang, and Masoud Najaf Najafi. 2016. “Characterisation of Whey Protein Isolate-Gum Tragacanth Electrostatic Interactions in Aqueous Solutions.” *International Journal of Food Science and Technology* 51 (5): 1220–27.
- Salminen, Hanna, and Jochen Weiss. 2014. “Effect of Pectin Type on Association and PH Stability of Whey Protein-Pectin Complexes.” *Food Biophysics* 9 (1): 29–38.
- Sanchez, C., M. Pouliot, S. F. Gauthier, and P. Paquin. 1997. “Thermal Aggregation of Whey Protein Isolate Containing Microparticulated or Hydrolyzed Whey Proteins.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45 (7): 2384–92.
- Scheer, August-wilhelm, Helmut Kruppke, and Ralf Heib. 2001. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH*.
- Schmitt, Christophe, Christian Sanchez, Sylvie Desobry-Banon, and Joël Hardy. 1998. “Critical Reviews in Food Science and Nutrition Structure and Technofunctional Properties of Protein- Polysaccharide Complexes : A Review Structure and Technofunctional Properties of Protein-Polysaccharide Complexes : A Review.” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 38 (8): 689–753.
- Schmitt, Christophe, and Sylvie L. Turgeon. 2011. “Protein/Polysaccharide Complexes and Coacervates in Food Systems.” *Advances in Colloid and Interface Science* 167 (1–2): 63–70.
- Shu, Yu Wei, Sigehiro Sahara, Soichiro Nakamura, and Akio Kato. 1996. “Effects of the Length of Polysaccharide Chains on the Functional Properties of the Maillard-Type Lysozyme-Polysaccharide Conjugate.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44 (9): 2544–48.
- Stone, Andrea K., Lam Lam Cheung, Chang Chang, and Michael T. Nickerson. 2013. “Formation and Functionality of Soluble and Insoluble Electrostatic Complexes within Mixtures of Canola Protein Isolate and (κ -, ι - and λ -Type) Carrageenan.” *Food Research International* 54 (1): 195–202.
- Stone, Andrea K., and Michael T. Nickerson. 2012. “Formation and Functionality of Whey Protein Isolate-(Kappa-, Iota-, and Lambda-Type) Carrageenan Electrostatic Complexes.” *Food Hydrocolloids* 27 (2): 271–77.
- Stone, Andrea K., Anzhelika Teymurova, Chang Chang, Lam Lam Cheung, and Michael T. Nickerson. 2015. “Formation and Functionality of Canola Protein Isolate with Both High- and Low-Methoxyl Pectin under Associative Conditions.” *Food Science and Biotechnology* 24 (4): 1209–18.
- Stone, Andrea K., Anzhelika Teymurova, and Michael T. Nickerson. 2014. “Formation and Functional Attributes of Canola Protein Isolate-Gum Arabic Electrostatic Complexes.” *Food Biophysics* 9 (3): 203–12.
- Tamm, F., G. Sauer, M. Scampicchio, and S. Drusch. 2012. “Pendant Drop Tensiometry for the Evaluation of the Foaming Properties of Milk-Derived Proteins.” *Food Hydrocolloids* 27 (2): 371–77.

- Timilsena, Yakindra Prasad, Bo Wang, Raju Adhikari, and Benu Adhikari. 2015. "Preparation and Characterization of Chia Seed Protein Isolate-Chia Seed Gum Complex Coacervates." *Food Hydrocolloids* 52: 554-63.
- Vinayahan, T., P. A. Williams, and G. O. Phillips. 2010. "Electrostatic Interaction and Complex Formation between Gum Arabic and Bovine Serum Albumin." *Biomacromolecules* 11 (12): 3367-74.
- Wang, Bo, Benu Adhikari, and Colin J. Barrow. 2014. "Optimisation of the Microencapsulation of Tuna Oil in Gelatin-Sodium Hexametaphosphate Using Complex Coacervation." *Food Chemistry* 158: 358-65.
- Wang, Zhengshan, Sha Zhang, and Bongkosh Vardhanabhuti. 2015. "Foaming Properties of Whey Protein Isolate and λ -Carrageenan Mixed Systems." *Journal of Food Science* 80 (8): N1893-1902.
- Weinbreck, Fanny, Hans Nieuwenhuijse, Gerard W. Robijn, and Cornelis G. De Kruif. 2003. "Complex Formation of Whey Proteins: Exocellular Polysaccharide EPS B40." *Langmuir* 19 (22): 9404-10.
- Wierenga, P. A., and H. Gruppen. 2010. "New Views on Foams from Protein Solutions." *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 15 (5): 365-73.
- Wilde, P. J. 2000. "Interfaces: Their Role in Foam and Emulsion Behaviour." *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 5 (3-4): 176-81.

Optimization of the interaction of whey protein concentrate-cress seed gum using response surface methodology (RSM) and investigating the foaming properties of the optimal sample

Z. Kholoosi¹, M. Mazaheri Tehrani^{2*}, S. M. A. Razavi²

Received: 2020.05.11

Accepted: 2020.07.23

Introduction: Proteins and polysaccharides are natural biopolymers that consider among the most widely used hydrocolloids in the food industry (Gaonkar and McPherson 2006) Which are often used simultaneously to improve functional properties. In electrostatic interaction, positively charged proteins with polysaccharides containing negative groups below the protein isoelectric point (PI) (LEE, MORR, and HA 1992), Leads to the formation of macromolecular particles by creating molecular aggregates rich in biopolymers suspended in the aqueous phase, called complex coacervate, which cause the coagulation and spontaneous separation of the phase. The ratio of protein-polysaccharide biopolymers and the pH of the mixture are important factors influencing the adsorption and compatibility of protein-polysaccharides as well as the characteristics of their aggregates (Shu et al. 1996). For this purpose, the optical density (turbidity) of protein-polysaccharide mixtures and the yield of dried sediments in this study as a basis for optimizing the complex coacervate process as in previous studies (Wang, Adhikari, and Barrow 2014; Huang et al. 2012) were used. In the present study, the optimization of complex coacervate formation conditions of whey protein concentrate-cress seed gum as well as the foaming properties of complex coacervate were studied for the first time. Whey proteins, as amphiphilic macromolecules, can adsorb at the interface (Scheer, Kruppke, and Heib 2001; Tamm et al. 2012; Wierenga and Gruppen, 2010) and form a viscoelastic adsorbent layer (Wilde 2000). Also, whey protein acts as a foaming agent with the ability to be adsorbed at the joint water-oil and water-air interface through hydrophobic interactions or disulfide bridges, and intermolecular bonds (Nicorescu et al. 2008; Nicorescu *et al.*, 2008; Dickinson, 1992; Forschen, 2017). Cress seed gum has rheological, emulsifying, favorable foaming properties and is stable in a wide range of heat, cold, salt, and pH with synergistic effects in the presence of sugars (sucrose, lactose). These properties are important in stabilizing emulsions and foams. The general purpose of this study was to achieve the optimal point of electrostatic interaction of different ratios of whey protein concentrate with cress seed gum in the pH range of 2 to 7 using response surface methodology and to investigate the foaming properties of the coacervate complex at the optimal point in comparison with Pure control protein in the same ratio.

Materials and Methods: The raw materials of this study included cress seed, whey protein concentrate with 80% purity (from Milli com., Germany), and hydrochloric acid with 37% purity (from Merck Com.). Different protein-polysaccharide mixtures were prepared to optimize the electrostatic interaction with the ratio of biopolymers (1: 5 to 5: 1 w / w) and pH of interaction (2 to 7). Mixtures, in the ratio determined by the software and the total concentration of biopolymer (0.3%), were prepared, and after 15 minutes of stirring and equilibration with the environment, were adjusted by hydrochloric acid of 0.1, 0.5, and 1 (n) to the desired pH, and stirred for 5 minutes at each pH with a magnetic stirrer at 400 rpm. Optical Density (OD) of protein: polysaccharide mixtures was evaluated by visible-ultraviolet optical spectrophotometry (Unico, Model S-2150, USA). To optimize the electrostatic complex coacervation process, the coacervation yield was determined. The result of the interaction of whey protein concentrate and cress seed gum as a function of pH and protein to gum ratio was investigated by measuring the sediment phase. For investigation of the foaming properties, the dispersions were homogenized using a homogenizer (Ultra Turrax T25 Digital) for 5 minutes at a speed of 10,000 rpm. After recording the sample volume in the dimension and before homogeneity, the foaming capacity was calculated. To determine the stability of the foam, changes in the volume of the samples were recorded and calculated after 30 minutes of foaming. In this study, the effect of two independent variables including the ratio of biopolymers in the range of 0.2-5 (w/w) and the pH within the range of 2 to 7 were analyzed using Design-Expert software based on two responses including turbidity and yield by the combined central design (CCD) with 5 replications to optimize the electrostatic interaction of whey protein concentrate with cress seed gum.

1 and 2. PhD Student and Professor, Center of Excellence in Native Natural Hydrocolloids of Iran, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

(*Corresponding Author Email: mmtehrani@um.ac.ir)

Results and Discussion: The results obtained by using response surface methodology showed that the independent variables (ratio of whey protein to cress seed gum and pH) in this study affected the studied responses (turbidity and sediment percentage), although pH had the greatest effect. Optimal conditions for the formation of the maximum protein-polysaccharide coacervate complex were obtained in the ratio of protein to polysaccharide 5: 1 (w / w) and pH 4.24. The results of foaming properties at the optimal point showed an increase in foaming capacity and foam stability compared to pure protein (control sample). This increase in foaming properties is probably due to the presence of cress seed gum and its effect on the formation of a thick viscoelastic film, improved protein adsorption at the interface, and increased bulk phase viscosity.

Keywords: Complex Conservation, Cress seed gum, Foaming, Optimization, Whey protein