

بهبود ویژگی‌های امولسیون‌کنندگی صمغ فارسی (*Amygdalus scoparia Spach*) از طریق ایجاد کمپلکس کووالانسی با بتالاکتوگلوبولین

عبدالخالق گل کار^۱، علی نصیرپور^{۲*}، جواد کرامت^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۹/۲۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۳/۱۷

چکیده

صمغ فارسی، صمغی طبیعی بوده که از درخت بادام کوهی (*Amygdalus scoparia Spach*) ترشح می‌شود. در این مطالعه، ویژگی‌های امولسیون‌کنندگی صمغ فارسی طی حرارت دادن خشک و ایجاد اتصال کووالانسی با بتالاکتوگلوبولین در چندین نسبت بتالاکتوگلوبولین / صمغ فارسی (۱:۱، ۲:۱ و ۱:۲) بهبود یافت. در ابتدا، اتصال کووالانسی بین بتالاکتوگلوبولین و صمغ فارسی به کمک SDS-PAGE تأیید شد. ویژگی‌های امولسیون‌کنندگی کمپلکس کووالانسی بتالاکتوگلوبولین: صمغ فارسی (۱:۱) با گذشت زمان واکنش مایلارد بررسی گردید. نتایج اندیس فعالیت امولسیون (EAI) و اندیس پایداری امولسیون (ESI) کمپلکس‌های کووالانسی بتالاکتوگلوبولین: صمغ فارسی (۱:۱) نشان داد که زمان حرارت دادن خشک اثر معنی داری ($P < 0.05$) روی EAI نداشت، اما ESI به طور معنی داری ($P < 0.05$) با گذشت زمان تا دو هفته افزایش یافت و ESI کمپلکس دو هفته گرمخانه‌گذاری شده نسبت به بقیه (شاهد، صفر ساعت، ۴۸ ساعت، ۱۹۲ ساعت) به طور معنی داری ($P < 0.05$) بالاتر بود. اندیس خامه‌ای شدن کمپلکس بتالاکتوگلوبولین: صمغ فارسی (۱:۱) با پیشرفت واکنش مایلارد کاهش یافت و همبستگی خوبی بین پیشرفت واکنش و اندیس خامه‌ای شدن حاصل شد. در انتها، امولسیون‌های تولیدی به کمک ارزیابی توزیع اندازه ذرات‌شان طی نگهداری تسریع شده و انجمادزایی با هم مقایسه شدند. نتایج نشان داد که کمپلکس کووالانسی بتالاکتوگلوبولین: صمغ فارسی (۱:۱) پایداری امولسیون بهتری در مقایسه با دیگر نسبت‌های پروتئین / پلی‌ساکارید (۱:۲ و ۲:۱)، صمغ فارسی تنها و صمغ عربی از خود نشان داد. به علاوه، بررسی ریز ساختار امولسیون‌های تولیدی نیز گواهی بر بهبود ویژگی امولسیون‌کنندگی صمغ فارسی بود.

واژه‌های کلیدی: صمغ فارسی، *Amygdalus scoparia Spach*، بتالاکتوگلوبولین، امولسیون، هیدروکلوئید، کمپلکس کووالانسی

مقدمه

امولسیون‌کنندگی پروتئین‌ها، ایجاد کمپلکس با پلی‌ساکاریدهاست. به طور کلی، پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها ممکن است به دو طریق به یکدیگر متصل شوند: (۱) اتصال کووالانسی یا (۲) برهم‌کنش‌های الکترواستاتیک (Dickinson, 2009). مزیت اصلی کمپلکس‌های کووالانسی نسبت به الکترواستاتیک، پایداری آنها به شرایط فیزیوشیمیایی محیط همچون pH، قدرت یونی و دما است (Dickinson et al., 1991). معمولاً، کمپلکس‌های کووالانسی با تیمار حرارتی خشک و بدون مواد شیمیایی تولید می‌شوند (بین گروه‌های آمینو پروتئین‌ها و گروه‌های کربونیل از پلی‌ساکاریدها) (Kato, 2002). پژوهش‌های متعددی در زمینه بهبود ویژگی‌های امولسیون‌کنندگی پروتئین‌ها (به‌خصوص پروتئین‌های شیر) طی کمپلکس کووالانسی با پلی‌ساکاریدها منتشر شده است (Akhtar et al., 2007; Dickinson et al., 1991; Neirynek et al., 2004; Yadav et al., 2010). بنابراین، کمپلکس‌های کووالانسی می‌تواند به عنوان یک امولسیفایر طبیعی جهت کاربردهای صنعتی به کار روند. همچنین، گزارش شده که کمپلکس‌های کووالانسی پروتئین-

به طور معمول، بیوپلیمرها در بسیاری از سیستم‌های غذایی به عنوان امولسیفایر یا پایدارکننده استفاده می‌شوند. در طی تشکیل امولسیون، پروتئین به سرعت جذب سطح ذرات چربی شده و از الحاق مجدد آنها جلوگیری می‌کند (Dickinson, 1999). اما ویژگی‌های امولسیون‌کنندگی پروتئین‌ها به واسطه توده‌ای شدن و رسوب دادن افت نموده و منجر به از بین رفتن دافعه ممانعتی و الکترواستاتیک می‌شود. این ناپایداری بیشتر در محدوده pH ایزوالکتریک و در غلظت بالای نمک اتفاق می‌افتد (Fennema, 1996). بنابراین، لازم است که ویژگی‌های امولسیون‌کنندگی پروتئین‌ها تحت شرایط نامساعد محیطی بهبود یابد. یکی از راه‌های بهبود ویژگی‌های

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار و دانشیار علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه اصفهان
* نویسنده مسئول: (Email: ali.nasirpour@cc.iut.ac.ir)

Spach) منطقه چنارناز واقع در استان یزد جمع‌آوری شد. ابتدا نمونه‌های با رنگ روشن‌تر جداسازی و با آسیاب چکشی خرد و در نهایت الک شدند. به منظور جداسازی ناخالصی‌ها، پودر صمغ آرام آرام به آب دیونیزه که روی همزن مغناطیسی قرار داشت، اضافه شد و بعد از دو ساعت هم خوردن، جهت کامل شدن روند هیدراتاسیون به مدت ۴۸ ساعت در یخچال نگهداری گردید. بعد از عبور محلول صمغ از فیلتر پارچه‌ای، طی زمان ۲۴ ساعت در دمای 40°C خشک شدند (دنا و کیوم، ایران). پودرهای منجمد-خشک شده تا زمان انجام آزمایش در دمای 4°C نگهداری گردید. بتالاکتوگلوبولین و صمغ عربی به ترتیب از شرکت دوپسکو آمریکا و سی ان آی فرانسه خریداری شدند. به علاوه، روغن سویا از سوپرمارکت محلی تهیه شد. دیگر مواد شیمیایی مصرفی دارای خلوص آزمایشگاهی بوده و تمامی نمونه‌ها با آب دیونیزه تهیه گردید.

روش‌ها

آماده‌سازی کمپلکس‌های کووالانسی بتالاکتوگلوبولین-صمغ فارسی: بتالاکتوگلوبولین و صمغ فارسی با نسبت‌های پروتئین/پلی ساکارید (۱:۱، ۱:۲، ۱:۱) و (۲:۱ وزنی/وزنی) به صورت خشک با هم مخلوط گردید و سپس پودر حاصل به آب دیونیزه (۱۰ برابر وزنی پودر مخلوط شده) که روی همزن مغناطیسی در حال چرخش بود، اضافه و بعد از مدتی هم خوردن جهت تسهیل هیدراتاسیون، به مدت یک شبانه روز محلول‌ها در دمای یخچال نگهداری شدند. سپس با استفاده از خشک‌کن انجمادی در دمای 40°C به مدت ۲۴ ساعت خشک شدند. برای تماس بهتر بین پروتئین و پلی‌ساکارید و انجام واکنش مایلارد، پودرهای خشک شده به روش تصعیدی به طور کامل آسیاب شدند. سپس، پودرها به صورت لایه نازکی در پتری دیش ریخته شده و برای دوره زمانی ۱۴-۱ روز در دسیکاتورهای دارای کلرید سدیم اشباع (رطوبت نسبی ۷۵٪) و در دمای 60°C گرمخانه‌گذاری شدند (Neirynek et al., 2004). بعد تیمار حرارتی خشک، به منظور یکنواخت ساختن رطوبت کمپلکس‌های کووالانسی بتالاکتوگلوبولین-صمغ فارسی، به مدت ۲۴ ساعت در دسیکاتور خلأ با مواد جاذب الرطوبه در کف، قرار گرفتند. سپس، کمپلکس‌های حاصل تا زمان استفاده در بسته‌های غیرقابل نفوذ به رطوبت در دمای 20°C نگهداری شدند.

پروفایل سدیم دوسیل سولفات-پلی آکریل آمید ژل الکتروفورز (SDS-PAGE) کمپلکس‌ها: تشکیل کمپلکس کووالانسی بتالاکتوگلوبولین-صمغ فارسی با SDS-PAGE تأیید شد (Laemmler, 1970). در این تست، ژل جداکننده آکریل آمید ۱۲٪ وزنی (بافر تریس-گلایسین ۱ مولار، $\text{pH}=6.8$) و ژل پشته‌سازی^۱

پلی ساکارید می‌تواند تعدادی از ویژگی‌های عملکردی دیگر را هم تحت تأثیر قرار دهند برای مثال حلالیت بخصوص در محدوده pH ایزوالکتریک (Mishra et al., 2001)، پایداری حرارتی (Jiménez-Castaño et al., 2007)، آلرژیسیتی (Usui et al., 2004)، فعالیت ضد میکروبی (Miralles et al., 2007) و پایداری کف (Dickinson et al., 1996). در مقابل، گزارشات متعددی در مورد پایداری امولسیون با پلی ساکارید طی ایجاد کمپلکس کووالانسی با پروتئین منتشر شده است. برخی از محققین معتقدند که هیدروکلوئیدها طی اتصال کووالانسی با پروتئین می‌توانند به عنوان امولسیفایرهای مؤثر عمل کنند (Garti et al., 2001). یکی از معروف‌ترین امولسیفایرهای هیدروکلوئیدی، صمغ عربی است. در واقع، صمغ عربی یک کمپلکس کووالانسی طبیعی پروتئین-پلی ساکارید بوده، و بخش پروتئینی نقش مهمی در ویژگی پایداری امولسیون آن دارد. از آنجایی که میزان پروتئین آن در حدود ۲٪ می‌باشد، بنابراین برای مؤثر بودن عملکرد امولسیون آن باید در غلظت نسبتاً بالا استفاده شود (Dickinson, 2008). از این رو، به دلیل قیمت نسبتاً بالای آن، پیشنهاد شده که با بیوپلیمرهای جدید، کمپلکس‌های پروتئین-پلی ساکارید جایگزین شود (برای مثال، کمپلکس کووالانسی پروتئین آب پنیر-مالتودکسترین (Akhtar et al., 2007)). براساس مطالعات اولیه مشاهده شد که پایین بودن ویژگی امولسیون‌کنندگی صمغ فارسی نسبت به صمغ عربی ممکن است ناشی از مقدار پایین پروتئین آن باشد (داده‌ها منتشر نشده). صمغ فارسی، صمغ طبیعی است که از درخت بادام کوهی (*Amygdalus scoparia Spach*) تراوش می‌شود. صمغی شفاف و با رنگ‌های مختلف (سفید، زرد، زرد-نارنجی، نارنجی-قرمز و قرمز) بوده که عمدتاً از مناطق جنوبی و غربی ایران جمع‌آوری می‌شود. مردم محلی از آن به عنوان یک افزودنی عملکردی برای کاربردهای تغذیه‌ای و داروسازی استفاده می‌کنند (Ghasempour et al., 2012; Jafari et al., 2012, 2013).

در این مطالعه، کمپلکس‌های کووالانسی بتالاکتوگلوبولین-صمغ فارسی به کمک تیمار حرارتی خشک تولید شد و ویژگی امولسیون‌کنندگی این کمپلکس‌ها با بررسی توزیع اندازه ذرات طی نگهداری تسریع شده و تحت شرایط انجماد زدایی و همچنین مشاهده میکروسکوپی با نمونه صمغ فارسی تنها و عربی مقایسه شدند. به علاوه، ترکیبات آمادوری، قهوه‌ای شدن و ویژگی‌های امولسیون‌کنندگی (فعالیت و پایداری امولسیون) با پیشرفت واکنش مایلارد اندازه‌گیری شد.

مواد و روش‌ها

مواد

صمغ فارسی از درختان بادام کوهی (*Amygdalus scoparia*)

۱۹۲ ساعت و ۲ هفته) با اندکی تغییر از روش پیرس و کینسلا^۱ تعیین شدند (Kim et al., 2003; Pearce et al., 1978). برای تهیه امولسیون، ۴ میلی‌لیتر روغن سویا و ۱۲ میلی‌لیتر محلول بیوپلیمری (۲۵٪ وزنی/حجمی پروتئین) در آب دیونیزه با استفاده از هموژنایزر در ۱۲۰۰۰ دور/دقیقه به مدت ۱ دقیقه هموژن گردید. سپس، هر ۲ دقیقه یک بار تا مدت زمان ۱۰ دقیقه، ۵۰ میکرولیتر امولسیون از ته ظرف خارج و با ۵ میلی‌لیتر SDS ۱٪ وزنی/حجمی رقیق شد. جذب امولسیون رقیق شده در ۵۰۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. اندیس فعالیت امولسیونی از جذب اندازه‌گیری شده در لحظه صفر و با استفاده از فرمول (۲) محاسبه شد:

$$EAI (m^2/g) = 2T / (1 - \Phi)C \quad (2)$$

در فرمول بالا T (کدورت) و از فرمول (۳) محاسبه می‌شود:

$$T = 2.303A/L \quad (3)$$

A، میزان جذب در لحظه صفر یعنی بلافاصله بعد از تولید امولسیون و L طول مسیر عبور پرتو در سل اسپکتروفتومتری است. همچنین، Φ حجم بخشی روغن و C غلظت پروتئین در محلول می‌باشد. برای تعیین اندیس فعالیت امولسیونی نیز از فرمول (۴) که در ادامه آورده شده، استفاده گردید:

$$ESI (min) = T_0t / \Delta T \quad (4)$$

T_0 کدورت در زمان صفر، ΔT تغییرات کدورت بین ۰ و ۱۰ دقیقه و t بازه زمانی است. تمامی اندازه‌گیری‌ها حداقل در سه تکرار انجام شدند.

آماده‌سازی امولسیون‌ها و اثر نگهداری تحت شرایط تسریع شده و رفع انجماد روی توزیع اندازه ذرات آنها: کمپلکس‌های بتالاکتوگلوبولین-صمغ فارسی در نسبت‌های پروتئین/پلی ساکارید (۱:۱، ۱:۲، ۲:۱) و صمغ فارسی تنها و عربی هر یک جداگانه و آرام آرام به آب دیونیزه که روی همزن مغناطیسی قرار داشت، اضافه شدند. برای تهیه امولسیون‌های روغن/آب (۴۰٪ حجمی/حجمی)، محلول بیوپلیمری (۱/۵٪ بیوپلیمر کل) و روغن سویا با هموژنایزر در ۱۲۰۰۰ دور/دقیقه به مدت ۲ دقیقه هموژن شدند. برای تعیین پایداری امولسیون، آن را تحت شرایط تسریع شده به مدت سه روز در دمای ۴۰ °C نگهداری گردید. به علاوه، همزمان نمونه‌ای دیگر به کمک نگهداری ۲۴ ساعته در فریزر با دمای

-۱۸ °C منجمد شده و سپس رفع انجماد صورت گرفت. نمونه‌ها در حمام آب با دمای ۴۰ °C به مدت یک ساعت رفع انجماد شدند. دستگاه پراکنش اشعه لیزر (هوریبا، LA-930، ژاپن)، مجهز به پرتو لیزر ۵ میلی‌ولت هلیوم/ نئون (۶۳۵ نانومتر) جهت بررسی توزیع اندازه ذرات به کار گرفته شد. ضریب شکست آب و روغن سویا به ترتیب ۱/۳۳۰ و ۱/۵۲۰ تنظیم گردید. برای جلوگیری از فلوکولاسیون ذرات

۵٪ وزنی (بافر تریس-گلیسین ۱/۵ مولار، pH=۸/۸) دارای SDS ۱٪ وزنی استفاده شد. نمونه‌های پروتئین (۵ میلی‌گرم) در ۱ میلی‌لیتر آب دیونیزه حل شدند. بعد از تیمار حرارتی در دمای ۹۵ °C به مدت ۵ دقیقه، ۱۸ میکرولیتر از نمونه با ۴ میکرولیتر کوماسی بریلیانت بلو و ۲/۵ میکرولیتر بتا-مرکاپتانول مخلوط شد و در انتها ۱۰ میکرولیتر از مخلوط حاصل به چاهک ژل، تزریق گردید. سپس، ژل در بافر تریس-گلیسین (pH=۸/۳) دارای SDS ۰/۵٪ وزنی و در جریان ثابت (۲۰۰ ولت) به مدت ۴۰ دقیقه راه‌اندازی شد.

تشکیل ترکیبات آمادوری و قهوه‌ای شدن: ترکیبات آمادوری و قهوه‌ای شدن به ترتیب با اندازه‌گیری جذب در ۳۰۴ و ۴۲۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر ماورابنفش-مرئی (یونیکو، انگلستان) در برابر نمونه کنترل (مخلوط خشک بتالاکتوگلوبولین و صمغ فارسی) تعیین شد (Zhu et al., 2008; Jiménez-Castaño et al., 2007). قبل از قرائت جذب در طول موج‌های مورد نظر، تمامی محلول‌های بتالاکتوگلوبولین-صمغ فارسی (۵٪ وزنی بیوپلیمر کل) به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰g سانتیفریژ شدند. فقط نسبت پروتئین/پلی ساکارید ۱:۱ برای بررسی روند واکنش مایلارد طی حرارت دادن خشک انتخاب گردید. به همین خاطر، نمونه‌ها در زمان‌های ۰ (بعد از خشک کردن انجمادی)، ۲۴، ۴۸، ۹۶، ۱۴۴، ۱۹۲ ساعت و دو هفته از دسیکاتور خارج شدند.

بررسی پیشرفت تیمار حرارتی خشک روی پایداری به خامه‌ای شدن: برای این آزمایش، مخلوط بتالاکتوگلوبولین-صمغ فارسی (شاهد) و کمپلکس‌های کوالانسی (۰، ۲۴، ۴۸، ۹۶، ۱۴۴، ۱۹۲ ساعت و ۲ هفته) با نسبت پروتئین/پلی ساکارید ۱:۱ در آب دیونیزه (۵٪ وزنی بیوپلیمر کل) پراکنده شدند. بعد از آن، ۱۲ میلی‌لیتر محلول بیوپلیمری و ۴ میلی‌لیتر روغن سویا با دستگاه هموژنایزر اُلترا تورا کس (T18، آیکاً آلمان) در ۱۲۰۰۰ دور/دقیقه به مدت ۲ دقیقه هموژن گردید. بعد از تهیه امولسیون، ۱۲ میلی‌لیتر از هر امولسیون در فالكون‌های ۱۵ میلی‌لیتری ریخته شدند و در دمای اتاق (۲۰±۱ °C) به مدت ۱۸۰ دقیقه نگهداری شدند. اندیس خامه‌ای شدن (CI) نیز به صورت چشمی با اندازه‌گیری ارتفاع لایه سرم در فالكون‌ها با گذشت زمان (هر ۳۰ دقیقه یکبار) تعیین شد (Lillard et al., 2009).

اندیس خامه‌ای شدن از فرمول (۱) محاسبه شد:

(۱)

$$100 \times \frac{\text{ارتفاع لایه سرم (فاز پایین) امولسیون}}{\text{ارتفاع کل امولسیون}} = \text{اندیس خامه‌ای شدن}$$

بررسی اثر واکنش مایلارد روی اندیس فعالیت امولسیونی و اندیس پایداری امولسیون کمپلکس کووالانسی بتالاکتوگلوبولین-صمغ فارسی: اندیس فعالیت امولسیون (EAI) و اندیس پایداری امولسیون (ESI) طی تیمار حرارتی (شاهد، ۰، ۴۸،

تیمار خشک متفاوت بود (مشاهده شکل ۱، نمونه ۵ و ۶). تقریباً در تمامی نمونه‌ها، یک باند در نزدیکی مرز پشته‌سازی و ژل جداکننده ظاهر شده است که می‌تواند مربوط به تغییرات pH دو ژل موردنظر باشد (در قسمت تهیه ژل SDS-PAGE عنوان شد) و رفتار مولکول‌ها را در طی حرکت در طول ژل تغییر می‌دهد. جالب است که باندهای بتالاکتوگلوبولین در تمامی نمونه‌های تیمار حرارتی شده کاملاً از بین نرفته، پس تحت این شرایط تمامی بتالاکتوگلوبولین با صمغ فارسی واکنش نداده است. اگرچه کاهش در باند بتالاکتوگلوبولین در نمونه ۷، مربوط به کمپلکس کووالانسی بیشتر بتالاکتوگلوبولین با صمغ فارسی است زیرا مقدار صمغ فارسی در این نسبت (بتالاکتوگلوبولین:صمغ فارسی ۲:۱) بیشتر می‌باشد. بنابراین، در تمامی کمپلکس‌های کووالانسی مقداری بتالاکتوگلوبولین واکنش نداده وجود دارد.

تشکیل ترکیبات آمادوری و قهوه‌ای شدن

واکنش بین بتالاکتوگلوبولین و صمغ فارسی باعث افزایش رنگ ظاهری طی زمان حرارت‌دادن شد که نشان‌دهنده به وجود آمدن محصولات مایلارد است زیرا مخلوط بتالاکتوگلوبولین-صمغ فارسی منجمد-خشک شده اولیه سفیدرنگ بود اما کمپلکس‌های کووالانسی حاصل براساس میزان صمغ فارسی محدوده رنگی بین زرد تا قهوه‌ای داشتند. همانطوری که در شکل ۲ نشان داده شده است، تشکیل ترکیبات آمادوری بعد از یک روز گرمخانه‌گذاری در دمای ۶۰°C قابل ملاحظه بود که می‌تواند مربوط به ساختار باز صمغ فارسی باشد که در دسترس بودن گروه‌های کربونیل صمغ، امکان واکنش با گروه‌های آمینو بتالاکتوگلوبولین را بخوبی فراهم می‌آورد. به علاوه، حداکثر تشکیل ترکیبات آمادوری بعد از چهار روز گرمخانه‌گذاری مشاهده شد ولی کاهش اندکی بین چهار و شش روز گرمخانه‌گذاری وجود دارد. بعد از اندازه‌گیری حداکثر ترکیبات آمادوری در روز چهارم گرمخانه‌گذاری، ترکیبات آمادوری کاهش یافت که احتمالاً در این مرحله تخریب ترکیبات آمادوری سریعتر از تشکیل آنهاست و یا اینکه به ترکیبات قهوه‌ای شدن تبدیل شدند که با افزایش در ترکیبات قهوه‌ای شدن (شکل ۲، مورد ۲) قابل تأیید است. این نتایج با مشاهدات Wang و همکارانش (۲۰۱۲) همخوانی دارد. افزایش ترکیبات قهوه‌ای شدن بعد چهارده روز، به صورت چشمی هم قابل مشاهده بود. مشاهده شد که اندازه‌گیری اولیه در ۳۰۴ نانومتر برای مخلوط بتالاکتوگلوبولین-صمغ فارسی منجمد-خشک شده پایین (۰/۰۴±۰/۰۱۷) اما این جذب برای ترکیبات قهوه‌ای شدن در ۴۲۰ نانومتر بسیار ناچیز (۰/۰۱±۰/۰۰۱) بود.

چربی، امولسیون‌ها به نسبت ۱:۱۰۰ با SDS ۰/۱٪ قبل از آنالیز اندازه ذرات رقیق شدند. میانگین اندازه ذرات به صورت درصد حجمی (d₄₃) گزارش شد زیرا نسبت به فلوکولاسیون و الحاق حساستر است. پایداری امولسیون طی نگهداری و انجماد زدایی به صورت بررسی توزیع اندازه ذرات و میانگین آنها با امولسیون‌های تازه ارزیابی شدند.

ریز ساختار امولسیون‌ها: جهت عکس‌برداری از نمونه‌ها و بررسی یکنواختی ذرات چربی، مقداری از امولسیون موردنظر را با SDS ۰/۱٪ وزنی/حجمی مخلوط و بعد از قرار دادن یک قطره از محلول روی اسلاید در زیر میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین، عکس برداری انجام گرفت. کلیه عکس‌ها با بزرگنمایی ۴۰۰× گرفته شدند.

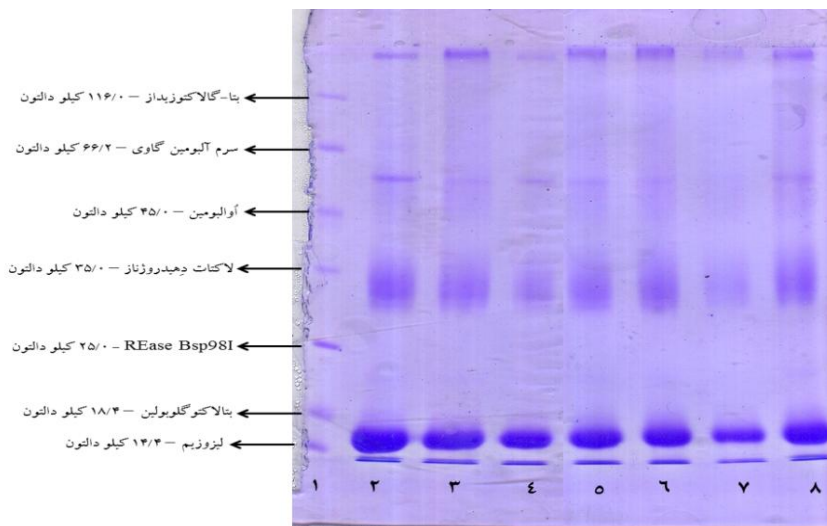
تجزیه و تحلیل داده‌ها: کلیه آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی و حداقل با سه تکرار انجام شدند. به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها، از رویه تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.0 استفاده گردید. تمامی مقایسه میانگین‌ها با آزمون LSD (حداقل تفاوت معنی‌دار) در سطح معنی‌دار ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

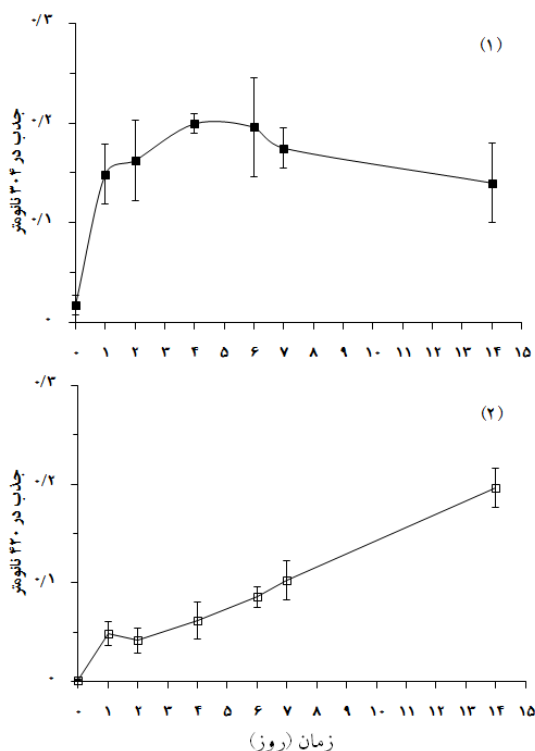
پروفایل SDS-PAGE کمپلکس‌های بتالاکتوگلوبولین-صمغ

فارسی

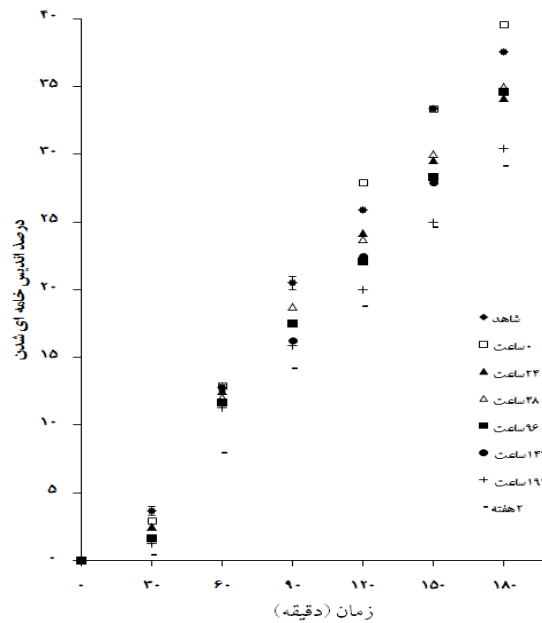
همانطوری که در پژوهش‌های قبلی برای سیستم‌های پروتئین-پلی‌ساکارید دیگر گزارش شد، تشکیل کمپلکس کووالانسی با آنالیز SDS-PAGE تأیید می‌شود (Akhtar *et al.*, 2007; Kasran *et al.*, 2004). پروفایل SDS-PAGE بتالاکتوگلوبولین طبیعی، بتالاکتوگلوبولین تیمار حرارتی شده و کمپلکس‌های کووالانسی بتالاکتوگلوبولین-صمغ فارسی با نسبت‌های بیوپولیمیری ۱:۱، ۱:۲ و ۲:۱ در شکل ۱ نشان داده شده است. جابه جایی باند بتالاکتوگلوبولین در آنالیز SDS-PAGE، تشکیل پایدار بتالاکتوگلوبولین کمپلکس کووالانسی شده به صمغ فارسی را تأیید کرد (نمونه ۲ در مقایسه با نمونه ۵، ۶، ۷ و ۸). بعلاوه، به این نکته باید توجه کرد که تیمار حرارتی خشک اثر زیادی روی الگوهای SDS-PAGE بتالاکتوگلوبولین تنها دارد (نمونه ۲ و ۳). همچنین، با مشاهده ابتدای شروع ژل در بالای صفحه ژلی، می‌توان گفت که ترکیبات با وزن مولکولی بالا بعد تیمار حرارتی به وجود آمده است. این روند به طور واضحی در نمونه ۴ برای بتالاکتوگلوبولین-صمغ فارسی (۱:۱) قبل اعمال تیمار حرارتی و نمونه‌های بعدی (۵، ۶، ۷ و ۸) مربوط به کمپلکس کووالانسی بتالاکتوگلوبولین-صمغ فارسی با نسبت‌های مختلف، قابل مشاهده است اما این مشاهدات برای نمونه ۴ دیده نشد (برهمکنش الکترواستاتیکی). الگوهای SDS-PAGE برای کمپلکس‌های یک و دو هفته گرمخانه‌گذاری شده به صورت



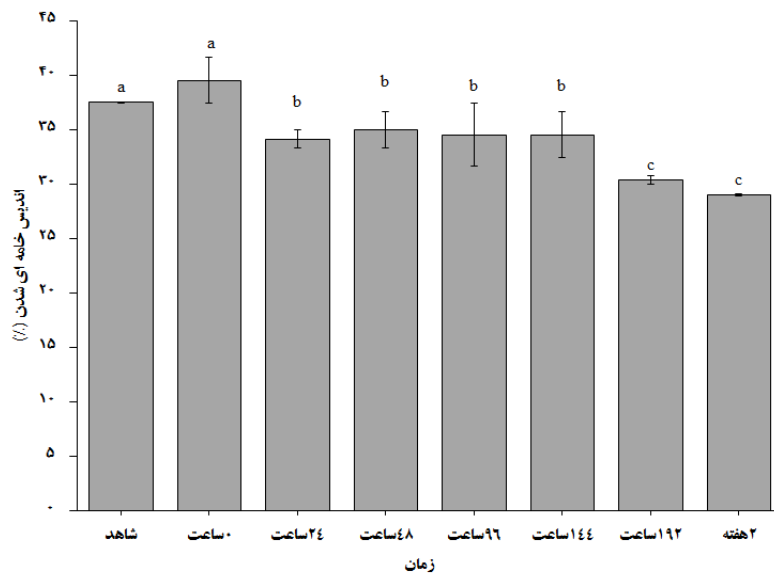
شکل ۱- پروفایل SDS-PAGE بتالاکتوگلوبولین (قبل و بعد تیمار حرارتی) و کمپلکس‌های کووالانسی (قبل و بعد تیمار حرارتی) با صمغ فارسی. نمونه ۱: نشانگر پروتئینی، نمونه ۲: بتالاکتوگلوبولین طبیعی، نمونه ۳: بتالاکتوگلوبولین بعد تیمار حرارتی خشک، نمونه ۴: بتالاکتوگلوبولین:صمغ فارسی (۱:۱) منجمد-خشک شده و قبل تیمار حرارتی، نمونه ۵: بتالاکتوگلوبولین:صمغ فارسی (۱:۱) و تیمار حرارتی خشک به مدت یک هفته، نمونه ۶: بتالاکتوگلوبولین:صمغ فارسی (۱:۱) و تیمار حرارتی خشک به مدت دو هفته، نمونه ۷: بتالاکتوگلوبولین:صمغ فارسی (۲:۱) و تیمار حرارتی خشک به مدت دو هفته، نمونه ۸: بتالاکتوگلوبولین:صمغ فارسی (۱:۲) و تیمار حرارتی خشک به مدت دو هفته



شکل ۲- تشکیل ترکیبات آمادوری و قهوه‌ای شدن در کمپلکس کووالانسی بتالاکتوگلوبولین/صمغ فارسی (۱:۱) گرمخانه‌گذاری شده در ۶۰°C به مدت ۱۴ روز. این ترکیبات به ترتیب در ۳۰°C و ۴۲۰ نانومتر بررسی شدند. میله‌های خطا نشان‌دهنده انحراف استاندارد دو آزمایش جداگانه است.



شکل ۳- تغییر درصد اندیس خامه‌ای شدن امولسیون‌ها با زمان. امولسیون‌ها با کمپلکس‌های کووالانسی بتالاکتوگلوبولین-صمغ فارسی (۱:۱) در زمان‌های مختلف (مخلوط دو بیوپلیمر به عنوان شاهد، ۰، ۲۴، ۴۸، ۹۶، ۱۴۴، ۱۹۲ ساعت و دو هفته) تهیه شدند. هر عدد میانگین سه تکرار جداگانه است.



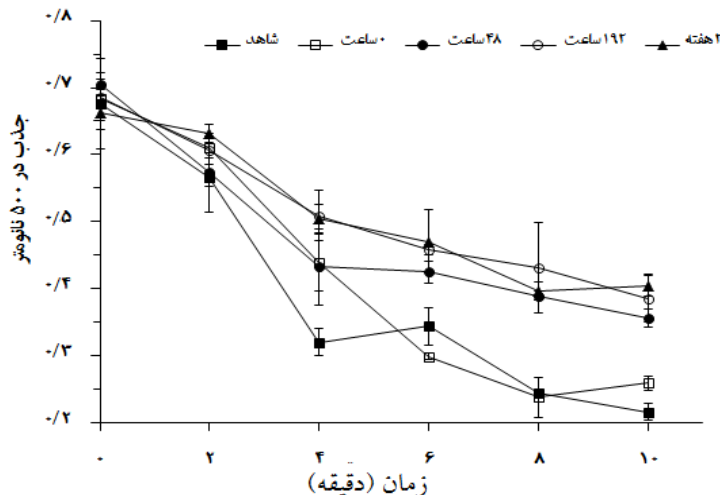
شکل ۴- اندیس خامه‌ای شدن نهایی امولسیون‌ها بعد از ۱۸۰ دقیقه برای کمپلکس‌های کووالانسی بتالاکتوگلوبولین-صمغ فارسی (شاهد، ۰، ۲۴، ۴۸، ۹۶، ۱۴۴، ۱۹۲ ساعت و دو هفته). میله‌های خطا نشان‌دهنده انحراف استاندارد بر اساس سه آزمایش نشان می‌دهند. کدهای متفاوت (a-c) اختلاف معنی‌دار در $P < 0.05$ را نشان می‌دهند.

هفته انکوبه شده، تفاوت معنی‌داری ($P < 0.05$) با دیگر کمپلکس‌های کووالانسی (شاهد، ۰، ۴۸ و ۱۹۲ ساعت) داشت. به علاوه، تفاوت معنی‌داری بین ESI کمپلکس شاهد و صفر ساعت و نیز ۴۸ و ۱۹۲ ساعت وجود ندارد ($P < 0.05$). همچنین، قابل

مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که تیمار حرارتی خشک اثر معنی‌داری روی EAI در دوره‌های زمانی نداشت (شاهد، ۰، ۴۸، ۱۹۲ ساعت و دو هفته) اما ESI به طور معنی‌داری تا دو هفته افزایش یافت. در حقیقت، ESI کمپلکس بتالاکتوگلوبولین-صمغ فارسی دو

پلی‌ساکارید بود (Diftis et al., 2003; Kasran et al., 2013; Kim et al., 2003; Usui et al., 2004; Yadav et al., 2010).

توجه است که ESI کمپلکس شاهد و صفر ساعت انکوبه شده تفاوت معنی‌داری در مقایسه با ۴۸ و ۱۹۲ ساعت گرمخانه گذاری نشان داد (جدول ۱). این نتایج مشابه نتایج پژوهش‌های قبلی در زمینه بهبود ویژگی‌های امولسیون‌کنندگی کمپلکس‌های کووالانسی پروتئین-



شکل ۵- تغییر کدورت امولسیون کمپلکس کووالانسی بتالاکتوگلوبولین- صمغ فارسی در زمان‌های مختلف (شاهد، ۰، ۴۸، ۱۹۲ ساعت و دو هفته) در برابر زمان (دقیقه). هر عدد میانگین سه تکرار ± انحراف از میانگین است.

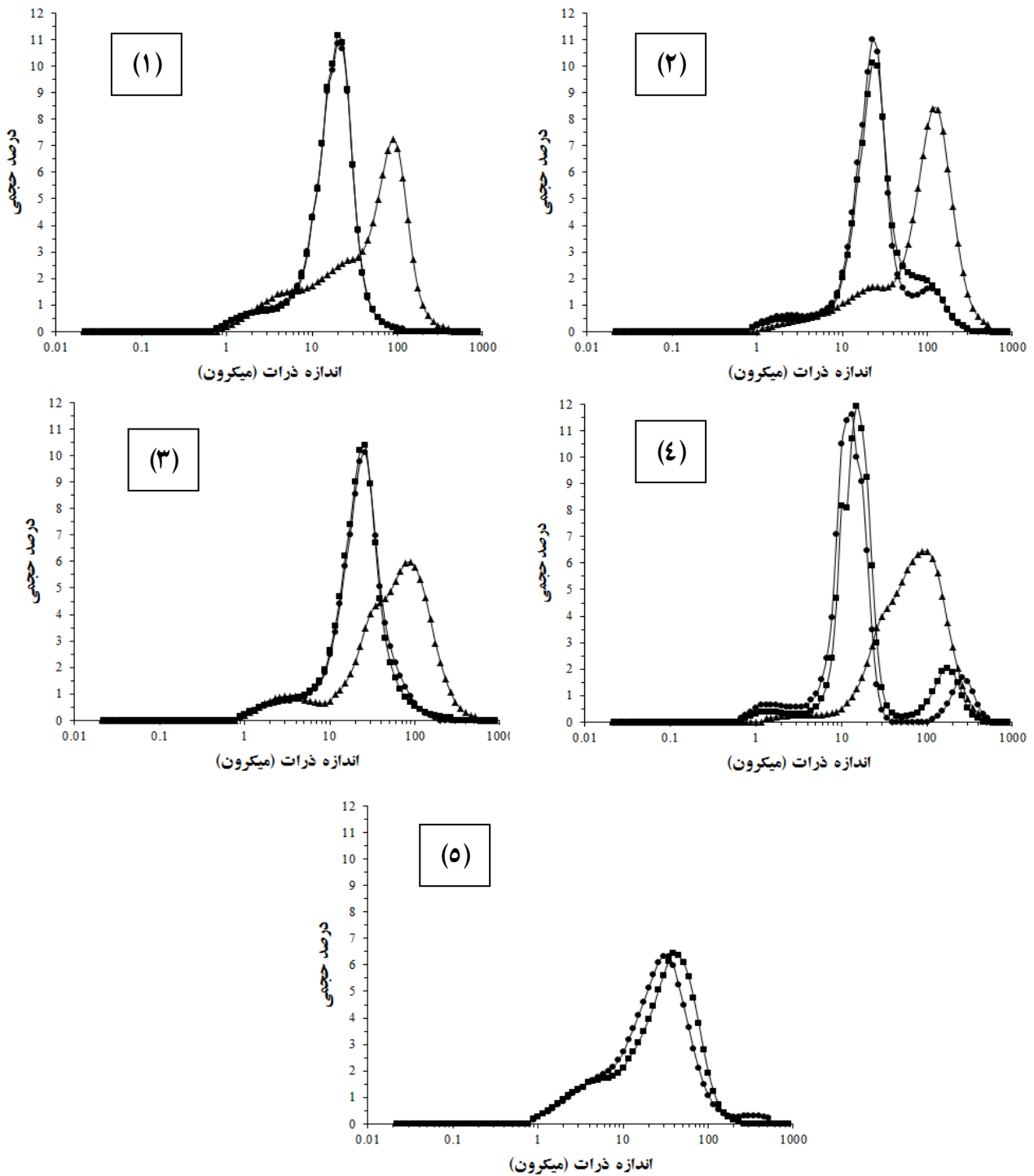
مورد، احتمالاً ویسکوزیته بالای محلول صمغ موردنظر باعث شده که عملکرد هموژنیزاسیون را کاهش دهد و منجر به تشکیل تعدادی ذرات چربی با اندازه بزرگ شود. Huang و همکاران (۲۰۰۱) چنین اثری را برای امولسیون صمغ زانتان مشاهده کردند (Huang et al., 2001). توزیع اندازه ذرات امولسیون صمغ فارسی و عربی نگهداری شده در دمای ۴۰°C به سمت اندازه ذرات بزرگتر حرکت کرد. بعلاوه، بعد از نگهداری مقداری خروج روغن هم مشاهده شد. ولی امولسیون کمپلکس‌های بتالاکتوگلوبولین- صمغ فارسی در مقایسه با صمغ فارسی و عربی، در تمامی نسبت‌ها ذرات کوچکتری تولید کردند و بعد از نگهداری تحت شرایط تسریع شده نیز اندازه ذراتی در حدود مقدار اولیه از خود نشان دادند. طی سه روز نگهداری در دمای ۴۰°C، میانگین اندازه ذرات امولسیون‌های صمغ فارسی، عربی و کمپلکس‌های بتالاکتوگلوبولین- صمغ فارسی در نسبت ۱:۱، ۱:۲ و ۲:۱ به ترتیب از ۳۴/۳۶ به ۳۴/۷۶ میکرون، ۳۴/۱۸ به ۳۳/۷۹ میکرون، ۱۷/۸۷ به ۱۷/۷۶ میکرون، ۳۱/۳۰ به ۳۴/۴۶ میکرون و ۲۵/۰۷ به ۲۴/۵۲ تغییر کرد. بعد تیمار رفع انجماد، امولسیون صمغ عربی شکسته شد و خروج روغن اتفاق افتاد زیرا مقدار صمغ استفاده شده برای پوشش دادن سطح تمام ذرات چربی کافی نیست. بنابراین، توزیع اندازه ذرات آن (در شکل ۶- مورد ۵) نشان داده نشده است. در حالی که این اتفاق برای امولسیون‌های صمغ فارسی و کمپلکس‌های کووالانسی بتالاکتوگلوبولین- صمغ فارسی مشاهده نشد.

اثر نگهداری در شرایط تسریع شده و تیمار رفع انجماد روی توزیع اندازه ذرات امولسیون‌ها

در این بخش عملکرد کمپلکس‌های کووالانسی پروتئین- پلی‌ساکارید برای تشکیل امولسیون‌های پایدار نسبت به صمغ فارسی و عربی تحت شرایط یکسان مقایسه شد. شکل ۶ توزیع اندازه ذرات امولسیون‌ها بلافاصله بعد از تولید و بعد از هر تیمار نشان می‌دهد. منحنی توزیع اندازه امولسیون‌ها نشان داد که امولسیون‌های صمغ فارسی و کمپلکس‌های کووالانسی بتالاکتوگلوبولین- صمغ فارسی در مقایسه با صمغ عربی روندی متفاوت داشت. در حقیقت، محدوده توزیع اندازه ذرات امولسیون صمغ عربی نسبت به بقیه امولسیون‌ها گسترده‌تر است. در حالی که منحنی توزیع اندازه ذرات امولسیون‌های صمغ فارسی و کمپلکس‌های بتالاکتوگلوبولین- صمغ فارسی پهنه کمتری دارند که نشان از یکنواختی ذرات چربی است. محدوده وسیع توزیع اندازه امولسیون صمغ عربی مربوط به الحاق شدید ذرات چربی بوده که صمغ عربی کمی برای پایدارسازی تمامی ذرات چربی طی هموژنیزاسیون موجود است.

Dickinson (۲۰۰۸) بیان کرد که برای تولید ذرات چربی با قطر کمتر از یک میکرون نسبت صمغ عربی: روغن تقریباً ۱:۱ نیاز است. در حالی که میزان صمغ عربی و روغن سویا در این پژوهش به ترتیب ۱/۵٪ وزنی و ۴۰٪ حجمی بود.

امولسیون صمغ فارسی توزیع اندازه ذرات دو پیکی داشت. در این



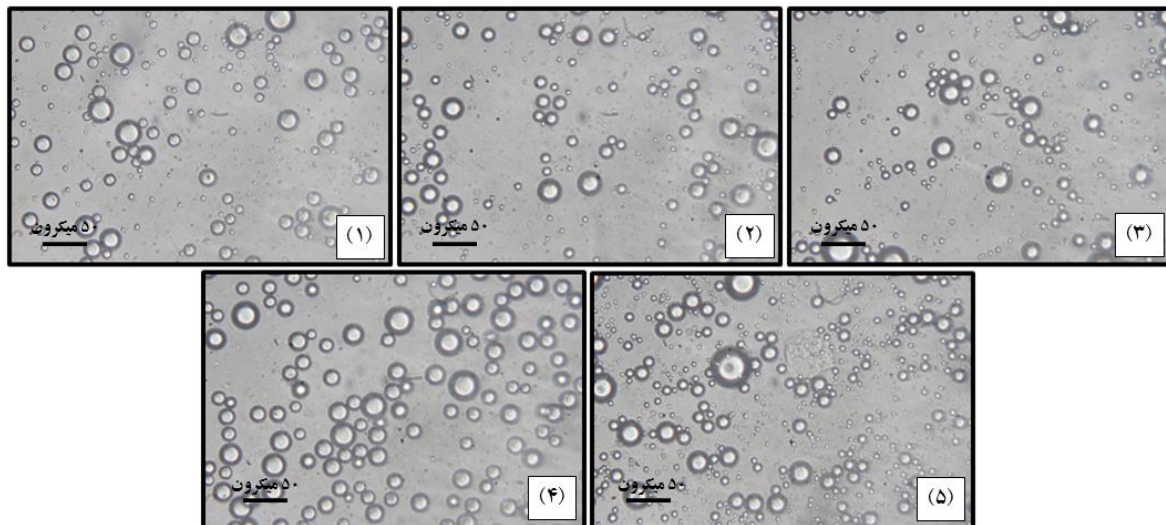
شکل ۶- مقایسه توزیع اندازه ذرات امولسیون‌ها بلافاصله بعد از تولید با نمونه‌های تیمار شده (۱/۵٪ بیوپلیمر و ۴٪ حجمی/حجمی روغن سویا).
 ● بلافاصله بعد از تولید، ■ بعد از نگهداری تحت شرایط تسریع شده (سه روز در ۴۰°C)، ▲ بعد رفع انجماد. منحنی‌های ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ به ترتیب نشان دهنده امولسیون‌های بتالاکتوگلوبولین: صمغ فارسی (۱:۱)، بتالاکتوگلوبولین- صمغ فارسی (۲:۱)، بتالاکتوگلوبولین: صمغ فارسی (۱:۲)، صمغ فارسی و عربی است. امولسیون صمغ عربی بعد رفع انجماد شکسته شد، از این رو منحنی توزیع اندازه ذرات آن بعد رفع انجماد رسم نشده است.

بتالاکتوگلوبولین - صمغ فارسی در شکل ۷ نشان داده شده است. مقایسه شکل‌های ۱ تا ۵ نشان می‌دهد که اتصال کووالانسی بین بتالاکتوگلوبولین و صمغ فارسی به طور کارآمدی اندازه ذرات امولسیون را کاهش داده و تعدادی زیادی ذرات چربی ریز در نمونه‌های ۱ تا ۳ در مقایسه با نمونه صمغ فارسی تنها حاصل شده است که نشان از بهبودی در ویژگی امولسیون کمپلکس‌هاست. ریز ساختار مربوط به صمغ عربی نیز نشان از ناهمگونی سیستم دارد که مربوط به الحاق ذرات چربی است زیرا میزان صمغ مصرفی ناچیز ($1/5\%$ وزنی صمغ در مقابل 40% حجمی/روغن) است.

با این وجود میانگین اندازه ذرات امولسیون صمغ فارسی بعد انجماد زدایی، افزایش قابل توجهی داشت. بعد از انجماد زدایی، میانگین اندازه ذرات امولسیون‌های صمغ فارسی و کمپلکس‌های بتالاکتوگلوبولین - صمغ فارسی در نسبت ۱:۱، ۲:۱ و ۱:۲ به ترتیب از $34/36$ به $80/96$ میکرون، $17/87$ به $57/49$ میکرون، $31/30$ به $100/45$ میکرون و $25/07$ به $70/32$ تغییر کرد.

ریز ساختار امولسیون‌ها

ریزساختار امولسیون‌های صمغ فارسی و عربی و کمپلکس‌های



شکل ۷- ریزساختار امولسیون‌های روغن در آب بلافاصله بعد از تولید. تمامی امولسیون‌ها دارای $1/5\%$ وزنی امولسیفایر و 40% حجمی/حجمی روغن سویاست. میله مقیاس = 50 میکرون. (۱) بتالاکتوگلوبولین:صمغ فارسی (۱:۱) - دو هفته گرمخانه‌گذاری شده. (۲) بتالاکتوگلوبولین-صمغ فارسی (۱:۱) - دو هفته گرمخانه‌گذاری شده. (۳) بتالاکتوگلوبولین-صمغ فارسی (۲:۱) - دو هفته گرمخانه‌گذاری شده. (۴) صمغ فارسی. (۵) صمغ عربی.

یکسان، کمپلکس‌های کووالانسی عملکرد بهتری در مقایسه با صمغ فارسی و عربی از خود نشان دادند. همچنین، امولسیون تولیدی با کمپلکس کووالانسی بتالاکتوگلوبولین-صمغ فارسی در نسبت ۱:۱، میانگین اندازه ذرات پایین‌تری از خود نشان داد. از اینرو، کمپلکس بتالاکتوگلوبولین:صمغ فارسی (۱:۱) پتانسیل استفاده به عنوان یک امولسیفایر مؤثر در فرمولاسیون امولسیون‌ها را داراست.

قدردانی

بدینوسیله نویسندگان بر خود لازم می‌دانند که از دانشگاه صنعتی اصفهان و شرکت فناوری غذا و سلامت پویان به جهت حمایت‌های مالی این پژوهش تشکر و قدردانی نمایند.

نتیجه‌گیری

کمپلکس‌های کووالانسی پروتئین-پلی‌ساکارید تولید شده به روش تیمار حرارتی خشک دارای ویژگی امولسیون‌کنندگی مطلوب‌تری نسبت به پروتئین و پلی‌ساکارید تنها می‌باشند. ثابت ماندن اندازه ذرات امولسیون کمپلکس‌های صمغ فارسی - بتالاکتوگلوبولین در مقایسه با صمغ فارسی تنها و عربی طی تیمارهای انجام شده، حاکی از آن است که این کمپلکس‌ها قادر به تولید امولسیون‌های پایدار هستند. بهبود قابلیت امولسیون‌کنندگی کمپلکس‌های کووالانسی بتالاکتوگلوبولین - صمغ فارسی ممکن است به واسطه جذب بخش پروتئینی در فضای بین سطحی و دافعه مانع‌بخش پلی‌ساکاریدی در اطراف ذرات چربی باشد. براساس نتایج بیان شده در بالا واضح است که در نسبت بیوپلیمر به روغن

منابع

- Akhtar, M. & Dickinson, E., 2007. Whey protein-maltodextrin conjugates as emulsifying agents: an alternative to gum arabic. *Food Hydrocolloids*, 21, 607-616.
- Dickinson, E., 1999. Adsorbed protein layers at fluid interfaces: interactions, structure and surface rheology. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 15, 161-176.
- Dickinson, E., 2008. Interfacial structure and stability of food emulsions as affected by protein-polysaccharide interactions. *Soft Matter*, 4, 932-942.
- Dickinson, E., 2009. Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food Hydrocolloids*, 23, 1473-1482.
- Dickinson, E. & Galazka, V. B., 1991. Emulsion stabilization by ionic and covalent complexes of β -lactoglobulin with polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 5, 281-296.
- Dickinson, E. & Izgi, E., 1996. Foam stabilization by protein-polysaccharide complexes. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 113, 191-201.
- Fennema, O. R., 1996. *Food Chemistry*, Marcel-Dekker, New York.
- Garti, N. & Leser, M. E., 2001. Emulsification properties of hydrocolloids. *Polymers for advanced Technologies*, 12, 123-135.
- Ghasempour, Z., Alizadeh, M. & Bari, M. R., 2012. Optimisation of probiotic yoghurt production containing Zedo gum. *International Journal of Dairy Technology*, 65, 118-125.
- Huang, X., Kakuda, Y. & Cui, W., 2001. Hydrocolloids in emulsions: particle size distribution and interfacial activity. *Food Hydrocolloids*, 15, 533-542.
- Jafari, S. M., Beheshti, P. & Assadpour, E., 2012. Rheological behavior and stability of D-limonene emulsions made by a novel hydrocolloid (Angum gum) compared with Arabic gum. *Journal of Food Engineering*, 109, 1-8.
- Jafari, S. M., Beheshti, P. & Assadpour, E., 2013. Emulsification properties of a novel hydrocolloid (Angum gum) for d-limonene droplets compared with Arabic gum. *International journal of biological macromolecules*, Accepted.
- Jiménez-Castaño, L., Villamiel, M. & López-Fandiño, R., 2007. Glycosylation of individual whey proteins by Maillard reaction using dextran of different molecular mass. *Food Hydrocolloids*, 21, 433-443.
- Kasran, M., Cui, S. W. & Goff, H. D., 2013. Emulsifying properties of soy whey protein isolate-fenugreek gum conjugates in oil-in-water emulsion model system. *Food Hydrocolloids*, 30, 691-697.
- Kato, A., 2002. Industrial Applications of Maillard-Type Protein-Polysaccharide Conjugates. *Food Science and Technology Research*, 8, 193-199.
- Kim, H. J., Choi, S. J., Shin, W. S. & Moon, T. W., 2003. Emulsifying properties of bovine serum albumin-galactomannan conjugates. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51, 1049-1056.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head to bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lillard, J., Clare, D. & Daubert, C., 2009. Glycosylation and expanded utility of a modified whey protein ingredient via carbohydrate conjugation at low pH. *Journal of Dairy Science*, 92, 35-48.
- Miralles, B., Martínez-Rodríguez, A., Santiago, A., van de Lagemaat, J. & Heras, A., 2007. The occurrence of a Maillard-type protein-polysaccharide reaction between β -lactoglobulin and chitosan. *Food chemistry*, 100, 1071-1075.
- Mishra, S., Mann, B. & Joshi, V., 2001. Functional improvement of whey protein concentrate on interaction with pectin. *Food Hydrocolloids*, 15, 9-15.
- Morris, G. A., Sims, I. M., Robertson, A. J. & Furneaux, R. H., 2004. Investigation into the physical and chemical properties of sodium caseinate-maltodextrin glyco-conjugates. *Food Hydrocolloids*, 18, 1007-1014.
- Neiryck, N., Van Der Meeren, P., Bayarri Gorbe, S., Dierckx, S. & Dewettinck, K., 2004. Improved emulsion stabilizing properties of whey protein isolate by conjugation with pectins. *Food Hydrocolloids*, 18, 949-957.
- Pearce, K. N. & Kinsella, J. E., 1978. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. *Journal of agricultural and food chemistry*, 26, 716-723.
- Usui, M., Tamura, H., Nakamura, K., Ogawa, T., Muroshita, M., Azakami, H., Kanuma, S. & Kato, A., 2004. Enhanced bactericidal action and masking of allergen structure of soy protein by attachment of chitosan through Maillard-type protein-polysaccharide conjugation. *Food/Nahrung*, 48, 69-72.
- Wang, Q. & 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.
- Yadav, M. P., Parris, N., Johnston, D. B., Onwulata, C. I. & Hicks, K. B., 2010. Corn fiber gum and milk protein conjugates with improved emulsion stability. *Carbohydrate Polymers*, 81, 476-483.
- Zhu, D., Damodaran, S. & Lucey, J. A., 2008. Formation of whey protein isolate (WPI)-dextran conjugates in aqueous solutions. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56, 7113-7118

Improvement of the Emulsifying Properties of Farsi Gum (*Amygdalus scoparia Spach*) through Maillard-type conjugation with β -lactoglobulin

A. Golkar¹, A. nasirpour^{2*}, J. Keramat³

Received: 2013. 12.18

Accepted: 2014.07.06

Introduction: Hydrocolloids are widely used in food systems as an emulsifying or stabilizing agent. One way to improve the emulsifying properties of hydrocolloids is complexation with proteins. In general, protein and hydrocolloid components may be combined together by either A) covalent bonding (conjugates) or B) electrostatic complexing. Conjugates can be efficiently prepared during the storage of freeze-dried or spray-dried powders of protein- hydrocolloid mixtures if stored at appropriate temperature and relative humidity. Farsi gum (FG) is a natural gum that exudated from mountain almond trees (*Amygdalus scoparia Spach*). In this study, BLG (β -lactoglobulin)-FG conjugates were prepared by dry heat treatment at different BLG/FG mixing ratios (1:1, 1:2 and 2:1) and emulsifying properties of these conjugates were characterized.

Materials and methods: Firstly, BLG and FG were dry mixed at BLG/FG (1:1, 1:2 and 2:1) weight mixing ratios. The BLG-FG mixtures were incubated at 60 °C for a period of 1-14 days in desiccators containing saturated NaCl (to have 75 % relative humidity). Formation of BLG-FG conjugates was confirmed by SDS-PAGE. With the advancement of Maillard reaction, Amadori and browning compounds formation was determined by the absorbance at 304 nm and 420 nm, respectively. Creaming Index (CI) was assessed by determining the height of serum layer developed during storage (at 30 min intervals for 180 min) in emulsion (0.5 wt. % total biopolymer and 25% v/v O/W). The emulsion activity index (EAI) and emulsion stability index (ESI) were determined by turbidimetric technique at 500 nm absorbance. In addition, the effect of storage (3 days) at accelerated condition (40 °C) and freeze-thaw treatment on droplet size distribution of emulsions (1.5 wt. % total biopolymer and 40 % v/v O/W) were evaluated by static light scattering. Finally, microstructure of BLG-FG emulsion was captured by light microscopy. Statistical analysis of the all data was carried out using SAS 9.1 with significance defined at $P < 0.05$.

Results & Discussion: BLG band movement on SDS-PAGE analysis showed that the formation of stable BLG was covalently bound to FG. In addition, SDS-PAGE patterns were different with the progress of conjugate reaction from the 1st week to the 2nd week. It should be noted that the bands of BLG in all heat-treated samples were not completely vanished, indicating all BLG had not been conjugated to FG under this reaction conditions. Reaction of BLG with FG resulted in a visual increase in color with heating time, suggesting that some Maillard products were formed. Formation of Amadori compounds was considerable after 1 day of incubation at 60 °C. In addition, the maximum formation of Amadori compounds occurred after 4 days of incubation. After 6 days of incubation, it started to decrease that related to the degradation of Amadori compounds was faster than their formation. CI was decreased with the advancement of Maillard-type conjugation of BLG:FG (1:1). A good correlation between reaction advancement and creaming index could be created. EAI and ESI of BLG:FG (1:1) conjugates showed that dry-heat treatment time had no significant ($P > 0.05$) effect on EAI. However, ESI was significantly increased over time and ESI of 2-week incubated BLG-FG conjugate was significantly different ($P < 0.05$) from others (control, 0 hour, 2 and 6 days). During 3 day-storage of emulsions at 40 °C, average droplet sizes of FG, GA, BLG-FG conjugates at 1:1, 1:2, and 2:1 weight mixing ratios were altered from 34.36 to 34.76 μm , 34.18 to 33.79 μm , 17.87 to 17.76 μm , 31.30 to 34.46 μm , and 25.07 to 24.52 μm , respectively. On the other hand, The average droplet size of emulsions after freeze-thaw treatment of FG, BLG-FG conjugates at 1:1, 1:2, and 2:1 weight mixing ratios was increased from 34.36 to 80.96 μm , 17.87 to 57.49 μm , 31.30 to 100.45 μm , and 25.07 to 70.32 μm , respectively. After freeze-thaw treatment, emulsion prepared with GA was broken down and oiling-off was observed. Based on droplet size distribution of emulsions, results showed that BLG:FG (1:1) conjugate had better emulsion stability with finer droplet size compared with other BLG/FG mixing ratios (1:2 and 2:1), native FG and gum Arabic. Moreover, microscopic features of emulsions were a suitable evidence for improvement of emulsifying properties of FG. It is clear from the above discussion that the BLG-FG conjugates

1, 2 and 3- MSc student, Assistant Professor and Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Agriculture Faculty, Isfahan University of Technology
(*Corresponding Author Email: ali.nasirpour@cc.iut.ac.ir)

(1:1, 1:2 and 2:1) performed much better than native FG and GA alone at the same emulsifier/oil ratio (1.5 wt. % total biopolymer and 40 % v/v oil).

Conclusion: Emulsion prepared with the BLG-FG conjugates at 1:1 weight mixing ratio exhibited a lower initial mean droplet diameter between others (BLG/FG at 1:2 and 2:1 weight mixing ratios, native FG, GA). Therefore, BLG-FG conjugates (1:1) have the potential for use as an effective emulsifier in emulsion formulation. However, finding the right reaction condition is necessary (time and temperature) in further researches.

Keywords: Farsi gum, *Amygdalus scoparia* Spach, β -lactoglobulin, Emulsion, Hydrocolloid, Conjugate