

نوع مقاله: علمی - پژوهشی

## پایداری نانوالیاف پروتئین آب‌پنیر در pH های مختلف

فلورا فرخی<sup>۱</sup>، فوزان بدیعی<sup>۲</sup>، محمدرضا احسانی<sup>۳</sup> و مریم هاشمی<sup>۴</sup>

۱ و ۳- به ترتیب: دانش‌آموخته دکتری؛ و استاد گروه علوم و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران  
۲- دانشیار پژوهش موسسه تحقیقات فنی و مهندسی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران  
۴- دانشیار پژوهش، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران  
تاریخ دریافت: ۹۸/۵/۴؛ تاریخ پذیرش: ۹۹/۲/۲

### چکیده

نانوالیاف پروتئینی با حرارت‌دهی پروتئین‌های کروی در دماهای بالاتر از دمای دناتورده شدن آن‌ها و در pH اسیدی به دست می‌آیند. این ساختارها، به طول حدود ۱ میکرومتر و قطر ۱ تا ۱۰ نانومتر، بسیار ناهمسان‌گرد هستند. هدف اصلی این پژوهش، تولید نانوالیاف از ایزوله پروتئین آب‌پنیر، بررسی ویژگی‌های ظاهری و عملکردی نانوالیاف به‌منظور کاربرد آنها به‌عنوان مواد اولیه تشکیل‌دهنده مواد غذایی است. نانوالیاف پروتئینی در دمای ۹۰ °C در غلظت ۲۰ mg mL<sup>-1</sup> تهیه شدند و ویژگی‌های ظاهری و عملکردی آنها در pH های ۲، ۴ و ۶ بررسی شد. نتایج به‌دست‌آمده با میکروسکوپ نیروی اتمی نشان‌داد با افزایش pH، میزان پایداری و تراکم نانوالیاف تولیدشده کاهش می‌یابد. ضمن آنکه نانوالیاف در pH های بالاتر، ظرفیت تولید و پایداری امولسیون بالاتر و انحلال‌پذیری بیشتری داشتند. همچنین با افزایش pH، میزان شفافیت نمونه‌ها کمتر و فاکتورهای رنگ‌سنجی آنها افزایش یافت. درعین حال، نانوالیاف در مقایسه با ایزوله پروتئین آب‌پنیر، به‌طور معنی‌داری ویژگی‌های امولسیون‌کنندگی بهتری نشان دادند ( $P < 0.05$ ). ویژگی‌های مطلوب عملکردی این نانوالیاف در مقایسه با نمونه ایزوله پروتئین آب‌پنیر، کاربرد آنها را به‌عنوان افزودنی بهبوددهنده ویژگی‌های محصولات غذایی تقویت می‌کند. از این ترکیبات می‌توان برای اصلاح ویژگی‌های کیفی، عملکردی و تکنولوژیکی محصولات غذایی با مقدار پروتئین بالا، غذای رژیمی، غذای بیماران، سالمندان و غذاهای کم‌کالری استفاده کرد.

### واژه‌های کلیدی

ایزوله پروتئین آب‌پنیر، درصد انحلال‌پذیری، ظرفیت امولسیون‌کنندگی، نانوالیاف پروتئین، میکروسکوپ نیروی اتمی

### مقدمه

(2008a). الیاف پروتئینی به سبب بالا بودن نسبت طول به قطرشان، می‌توانند به‌منظور بهبود ویژگی‌های بافتی و ساختاری مواد غذایی و به‌عنوان ترکیبات تشکیل‌دهنده ماده غذایی به کار روند (Akkermans *et al.*, 2008b; Rao *et al.*, 2009). بسیاری از پروتئین‌های کروی نظیر لیزوزیم،

نانوالیاف پروتئین<sup>۱</sup> از مولکول‌های پروتئین‌های کروی نشئت‌گرفته‌اند. این ساختارها، طولی در حدود ۱ و قطری در حدود ۱ تا ۱۰ دارند و بسیار ناهمسان‌گرد<sup>۲</sup> هستند، یعنی ویژگی‌های آنها در جهات مختلف، یکسان نیست (Akkermans *et al.*,

(1993)، انحلال پذیری و جذب آب و روغن (Kinsella & Morr, 1984)، از برهم کنش های درون مولکولی WPI، عوامل بیرونی (pH، دما، غلظت، قدرت یونی) و برهم کنش های احتمالی با دیگر ترکیبات تشکیل دهنده سیستم غذایی ناشی می شوند (McCrae et al., 1999). با وجود این، استفاده از نانوالیاف WPI در بهبود بسیاری از این ویژگی های کیفی و عملکردی مانند تولید ژل و بهبود ویسکوزیته و تولید کف و امولسیون قابل توجه است (Akkermans et al., 2008a; Kroes-Nijboer et al., 2012a; Loveday et al., 2012; Oboroceanu et al., 2011; Rao et al., 2009). ضرورت اصلی به کارگیری این ترکیبات غذایی عملکردی را می توان با ضرورت اصلاح و تغییر خواص بافتی برخی از مواد غذایی مرتبط دانست (Akkermans et al., 2008b; Rao et al., 2009). نانوالیاف به طور بهینه در pH اسیدی تولید می شوند، در حالی که pH بسیاری از محصولات غذایی در محدوده ۴/۰ تا ۷/۰ است و به این ترتیب، پایداری الیاف تولید شده در محدوده مختلف pH در مواد غذایی با اهمیت است (Kroes-Nijboer et al., 2012b).

به این تحقیق از آن رو پرداخته شد که توانایی بالقوه تشکیل این نانوالیاف، به عنوان ترکیبات تشکیل دهنده مواد غذایی با ویژگی های عملکردی خاص، از رویکردهای جدید در صنعت غذا به شمار می رود. در خصوص ویژگی های عملکردی نانوالیاف پروتئین در pH های متداول سیستم های غذایی مطالعات محدود شده است، و هدف اصلی از این تحقیق تولید نانوالیاف پروتئین آب پنیر و بررسی پایداری و برخی ویژگی های عملکردی آنها به عنوان ترکیبات تشکیل دهنده مواد غذایی در دو pH متداول سیستم های غذایی است.

اوآلبومین و سرم آلبومین گاوی توانایی تشکیل الیاف طویل را دارند. اما بتالاکتوگلوبولین اصلی ترین ترکیب ایزوله پروتئین آب پنیر<sup>۱</sup> (WPI) و پروتئینی با ویژگی های عملکردی مناسب، مهم ترین پروتئین آب پنیر در تشکیل نانوالیاف است (Akkermans et al., 2008a; Oboroceanu et al., 2014). بتالاکتوگلوبولین می توانند در اثر حرارت دهی پروتئین در دماهای بالاتر از ۸۰ °C به مدت ۶ تا ۲۴ ساعت، در شرایط اسیدی و قدرت یونی کم تشکیل شوند. در pH های نزدیک به نقطه ایزوالکتریک، توده پروتئینی بزرگ و کروی، شکل می گیرند، اما در pH های پایین تر از نقطه ایزوالکتریک، ساختارهای پروتئینی رشته ای و خطی<sup>۲</sup> تشکیل می شوند (Bolder et al., 2007; van der Linden & Venema, 2007; Loveday et al., 2012). تولید الیاف از دو مرحله تشکیل شده است: مرحله اول شامل دناتوراسیون (واسرشت شدن)، باز شدن نسبی تاخوردگی ها، افزایش تعداد صفحات بتا و شکل گیری اولیه توده های پروتئینی است، و مرحله دوم از به هم پیوستن این توده ها از طریق پیوندهای یونی به منظور تشکیل ساختار رشته ای و خطی طویل به واسطه برهم کنش های غیر کووالان شکل می گیرد. افزایش پیوندهای آب گریز ناشی از دناتوراسیون حرارتی پروتئین در شکل گیری ساختارهای الیاف تأثیر بسزایی دارد. از سوی دیگر، pH اسیدی نیز در تشکیل الیاف طویل و مناسب بسیار اثرگذار است (Akkermans et al., 2008a; Oboroceanu et al., 2011; Rao et al., 2009). برای اصلاح ویژگی های بافتی مواد غذایی، بهبود کیفی ترکیبات تشکیل دهنده آن نقش مهمی دارد. بسیاری از ویژگی های عملکردی WPI مانند قابلیت تشکیل ژل، تولید کف و امولسیون (Morr & Ha,

**مواد و روش‌ها****مواد**

ایزوله پروتئین آب‌پنیر WPI- GN-90 از شرکت Gallo Global Nutrition آمریکا خریداری شد. پودر ایزوله آب‌پنیر حاوی ۹۲ درصد پروتئین، ۵/۲ درصد رطوبت، ۳ درصد لاکتوز، ۱ درصد چربی و ۳/۵ درصد خاکستر بود.

**روش‌ها****تولید نانوالیاف ایزوله پروتئین آب‌پنیر**

دیسپرسیون پروتئین آب‌پنیر مطابق با روش کار Serfert *et al.*, 2014 و Akkermans *et al.*, 2008a با اندکی تغییر تولید شد. دیسپرسیون WPI در غلظت  $20 \text{ mg mL}^{-1}$  با آب مقطر دو بار تقطیر تهیه شد. به‌منظور خالص‌سازی و حذف هرگونه ناخالصی، pH محلول با هیدروکلریک اسید (HCl) در نرمالیت‌های مختلف (0.1-1 N) روی  $\text{pH} = 4/6$  تنظیم و محلول به مدت ۱۰ دقیقه در شتاب  $4200 \text{ g}$  سانتریفوژ شد (Universal 32 centrifuge, Froilabo, SW14R, England) با کاغذ صافی واتمن شماره یک و فیلتر سرنگی  $0/2$  میکرومتری از جنس پلی‌اترسولفون<sup>۱</sup> (BIOFACT, Germany) فیلتر شد. pH محلول رویی مجدداً با HCl روی ۲ تنظیم شد. غلظت نهایی محلول پس از خالص‌سازی مطابق با روش استاندارد بردفورد (Bradford, 1979) و با جذب در طول موج  $590 \text{ nm}$  با اسپکتروفتومتر (Infinite, M200 PRO, Tecan, Austria, GmbH) و توسط منحنی استاندارد BSA (سرم آلبومین گاوی) معادل  $1/9 \text{ mg mL}^{-1}$  تعیین شد. سپس محلول با به‌کارگیری هوموژنایزر با  $2000$  دور در دقیقه (Homogenizer- Stirrer, RZR 1, Heidolph, Germany) در دمای  $90^\circ \text{C}$  به مدت ۵ ساعت هم‌زده شد. بعد از اتمام فرآیند،

محلول نانوالیاف حاصل بلافاصله تا حصول دمای  $10^\circ \text{C}$  در آب یخ ( $\sim$  صفر درجه سلسیوس) قرار داده شد. pH دیسپرسیون با استفاده از HCl و سود (NaOH) در نرمالیت‌های مختلف (0.1-1 N) به‌طور جداگانه در سه محدوده pH (۲، ۴ و ۶) تنظیم و در ظرف‌های دربندی شده ریخته شد، ظرف‌ها در دمای  $4^\circ \text{C}$  یخچال‌گذاری شدند. بخشی از نمونه‌ها نیز با خشک‌کن انجمادی (Freeze Dryer, Operon, OPR-FDB-5503, Korea) در بسته در دمای  $20^\circ \text{C}$  - نگهداری شدند. ایزوله پروتئین آب‌پنیر فرآیند نشده، پس از خالص‌سازی به‌عنوان نمونه کنترل بررسی شد.

**بررسی ساختار میکروسکوپی نانوالیاف ایزوله پروتئین آب‌پنیر**

ساختار میکروسکوپی نانوالیاف WPI، با استفاده از میکروسکوپ نیروی اتمی<sup>۲</sup> (AFM) بررسی شد. سطح نمونه با میکروسکوپ نیروی اتمی مجهز به پروب روبشی پلاتینیومی به طول  $2 \mu\text{m}$  (Dualscope(tm)/Rasterscope(C26)/DME) قطر نوک کمتر از  $10 \text{ nm}$  و ثابت فنر  $42 \text{ (N/m)}$  و در حالت نیروی غیرتماسی آنالیز شد. از  $2 \mu\text{L}$  دیسپرسیون رقیق‌شده با غلظت  $10 \text{ ppm}$  استفاده شد. تصویرهای توپوگرافیک دو بعدی و سه بعدی با استفاده از نرم‌افزار DME-SPM Version 2.1.1.2، در مقیاس  $5 \mu\text{m}$  تهیه و ویرایش شدند (Jagtap & Ambre, 2006).

**اندازه‌گیری ظرفیت و پایداری امولسیون نانوالیاف ایزوله پروتئین آب‌پنیر**

ویژگی‌های امولسیون‌کنندگی نانوالیاف برابر با روش Pearce & Kinsella, 1978 اندازه‌گیری شد. دیسپرسیونی با غلظت  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  با نانوالیاف لیوفیلیزه شده در بافر فسفات ( $10 \text{ mM}$  فسفات و

1- Polyethersulfone

2- Atomic Force Microscopy (AFM)

اندیس پایداری امولسیون<sup>۲</sup> (ESI) نیز با استفاده از رابطه ۳ و پس از ده دقیقه محاسبه شد.

$$ESI (\text{min}) = \frac{T \times \Delta t}{\Delta T} \quad (3)$$

که در آن،

$T$  = میزان کدورت؛  $\Delta T$  = تغییر در کدورت پس از ده دقیقه؛ و  $\Delta t$  = معادل وقفه زمانی است.

### اندازه‌گیری انحلال‌پذیری نانوالیاف ایزوله پروتئین آب‌پنیر

انحلال‌پذیری نانوالیاف WPI مطابق با روش Martinez-Alvarenga *et al.*, 2014 اندازه‌گیری شد. دیسپرسیون نانوالیاف با غلظت ۱ mg mL<sup>-1</sup> تهیه شد. pH محلول با HCl و NaOH (N 0.1-1) در pH برابر ۲ تا ۸ تنظیم شد. دیسپرسیون‌ها ۴۵ دقیقه هم‌زده شدند و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ °C با شتاب ۱۰۰۰۰ g سانتریفوژ شدند. محلول رویی با کاغذ صافی واتمن شماره ۱ یک فیلتر شد. جذب با اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۸۰ nm اندازه‌گیری شد. به‌منظور تهیه محلول استاندارد، دیسپرسیون WPI با غلظت‌های ۰/۴، ۰/۸، ۱/۲، ۱/۶، ۲، ۲/۵ و ۳ تهیه شد. جذب با اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۸۰ nm اندازه‌گیری شد. مقدار پروتئین نمونه‌های نانوالیاف WPI با استفاده از معادله رگرسیون حاصل از منحنی استاندارد به‌دست‌آمده از نمونه استاندارد معین شد. میزان انحلال‌پذیری نمونه‌ها با استفاده از رابطه ۴ تعیین شد.

$$\text{درصد انحلال‌پذیری} = \frac{\left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right)_{\text{مقدار پروتئین سوپرناتانت}}}{\left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right)_{\text{مقدار پروتئین محلول اولیه}}} \times 100 \quad (4)$$

۱۵۰ mM کلرید سدیم، با pH ۷/۴ تهیه شد. سی میلی‌لیتر (۳۰ mL) از این دیسپرسیون با ۱۰ mL روغن ذرت مخلوط و با هوموژنایزر اولتراتوراکس (Ultra turrax Homogenizer, PT 3100 Polytron Kinematica, Switzerland) با سرعت ۱۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت دو دقیقه در دمای اتاق هم‌زده شد. پس از آن، ۱۰۰ μL از فاز انتهایی امولسیون حاصل با ۴ mL محلول ۰/۱ درصد سدیم‌دودسیل‌سولفات (SDS) مخلوط و ۱۰ ثانیه ورتکس شد. یک میلی‌لیتر (۱ mL) از امولسیون رقیق‌شده به کووت (با پهنای مسیر نور ۱ cm) منتقل و عدد جذب با اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۰۰ nm اندازه‌گیری شد. کدورت دیسپرسیون با استفاده از رابطه ۱ محاسبه شد.

$$\text{کدورت} = \frac{\text{عدد جذب در طول موج } (500 \text{ nm}) \times 2.0 \times 10^3}{\text{پهنای مسیر نور در کووت (m)}} \quad (1)$$

اندیس فعالیت یا ظرفیت امولسیون‌کنندگی<sup>۱</sup> (EAI) با استفاده از رابطه ۲ محاسبه شد.

$$EAI (\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}) = \frac{2 \times T \times \text{رقت}}{C \times \phi} \quad (2)$$

که در آن،

$C$  = وزن پروتئین برحسب میلی‌گرم در هر واحد حجمی فاز قبل از امولسیون‌شوندگی؛  $\phi$  = کسر حجمی روغن در امولسیون (در اینجا ۰/۶۷)؛  $T$  = میزان کدورت (با استفاده از رابطه ۱)؛ و فاکتور رقت معادل ۴۰۰۰ در نظر گرفته شد (فاکتور رقت برابر است با:  $f_e = \frac{\phi_i}{\phi}$  که در آن،  $\phi_i$  و  $\phi$  = کسر یا جزء حجمی اولیه و نهایی فاز روغن بعد از تهیه امولسیون).

اندازه‌گیری شد. میزان کدورت مطابق با روش Bryant & McClements, 1999 و اندازه‌گیری عدد جذب در طول موج ۶۰۰ nm اندازه‌گیری شد. میزان ماتی و غیرشفاف بودن دیسپرسیون‌ها با استفاده از روش Komsa-Penkova *et al.*, 1996 و اندازه‌گیری میزان جذب در طول موج ۴۳۰ nm محاسبه شد.

### روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

کلیه آزمون‌ها در قالب طرح فاکتوریل کاملاً تصادفی در حداقل سه تکرار دنبال شد. تجزیه و تحلیل نتایج (ANOVA یک‌طرفه) و (ANOVA دوطرفه) با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۲، در سطح احتمال ۵ درصد ( $p < 0.05$ ) و آزمون چند دامنه‌ای دانکن به‌منظور بررسی معنی‌دار بودن اختلاف میانگین‌ها انجام شد.

### نتایج و بحث

#### ویژگی ظاهری نانوالیاف ایزوله پروتئین آب‌پنیر

شکل ظاهری کلیه نمونه‌های دیسپرسیون نانوالیاف WPI و نمونه کنترل در شکل ۱ ارائه شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، تفاوت در رنگ و شکل ظاهری به‌وضوح در دیسپرسیون‌های نانوالیاف نسبت به یکدیگر و با نمونه کنترل منعکس شده است. در فرآیند تشکیل نانوالیاف از WPI، اندازه و نوع توده‌های پروتئینی شکل گرفته بستگی دارد به زمان و دمای حرارت‌دهی، غلظت پروتئین و pH. از این رو شکل‌گیری و پایداری ساختار الیاف حاصل، علاوه بر اینکه به میزان پیوندهای درون‌مولکولی وابسته است، عمدتاً تحت تأثیر تعادل و توازن قدرت یونی و pH قرار دارد (Akkermans *et al.*, 2008a; van der Linden & Venema, 2007).

#### اندازه‌گیری پارامترهای رنگ نانوالیاف ایزوله پروتئین آب‌پنیر

پارامترهای رنگ محلول‌های دیسپرسیون تازه تهیه‌شده نانوالیاف WPI و نیز نمونه‌های نانوالیاف لیوفیلیز شده به‌طور جداگانه با استفاده از دستگاه رنگ‌سنج مینولتا (Minolta Chroma Meter, CR-400, Konica Minolta, SENSING INC., Japan) و بر اساس سیستم Lab مطابق با استاندارد کمیسیون بین‌المللی<sup>۱</sup> CIELab اندازه‌گیری شد (Jones *et al.*, 2010). بر این اساس، فاکتورهای رنگ به‌صورت سیستم عددی \*L، مؤلفه روشنایی از سیاه به سفید (محدوده صفر تا ۱۰۰)، \*a (از - به + نشان‌دهنده سبزه به قرمز)، و \*b (از - به + نشان‌دهنده آبی به زرد) اندازه‌گیری می‌شوند. برای آنالیز کردن، از زمینه کاشی کالیبراسیون سفید (Calibration Plate, No. 21133063, Japan) استفاده شد.  $\Delta E$  (نشان‌دهنده اندازه تفاوت رنگ و تغییر رنگ کل) و فاکتور اندیس سفیدی<sup>۲</sup> دیسپرسیون‌ها که نشان‌دهنده میزان تمایل رنگ نمونه‌ها به سفیدی است، با استفاده از رابطه‌های ۵ و ۶ محاسبه شد.

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (5)$$

$$WI = 100 - \sqrt{(100 - L^*)^2 + (a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (6)$$

#### اندازه‌گیری میزان کدورت و میزان ماتی نانوالیاف ایزوله پروتئین آب‌پنیر

میزان کدورت<sup>۳</sup> (تیرگی و مه‌آلودگی) و میزان ماتی<sup>۴</sup> (کدر و غیرشفاف بودن) نانوالیاف به روش کدورت‌سنجی اندازه‌گیری شد. یک میلی‌لیتر از هر یک از دیسپرسیون‌های تازه تهیه‌شده نانوالیاف به کووت منتقل و عدد جذب با دستگاه اسپکتروفوتومتر

1-CIELAB color system: International Commission on Illumination (CIE)

3- Turbidity: The cloudiness or haziness of a fluid

2- Whiteness or Whitening Index (WI)

4- Opacity: The quality of lacking transparency or translucence which specifies the opacity/transparency.



شکل ۱-مقایسه ُ شکل ظاهری دیسپرسیون‌های نانوالیاف ایزوله پروتئین آب پنیر، A: دیسپرسیون اولیه پروتئین آب پنیر بعد از خالص‌سازی (نمونه کنترل). B: دیسپرسیون نانوالیاف در pH برابر ۲، C: دیسپرسیون نانوالیاف در pH برابر ۴، D: دیسپرسیون نانوالیاف در pH برابر ۶.

### بررسی ساختار میکروسکوپی نانوالیاف ایزوله پروتئین آب پنیر

تصویرهای توپوگرافیک دوبعدی و سه‌بعدی ساختار میکروسکوپی دیسپرسیون‌های تازه تهیه شده نانوالیاف ایزوله پروتئین آب پنیر و تنظیم شده در هر سه pH و نمونه کنترل، در شکل ۲ ارائه شده است. همان طور که مشاهده می‌شود، در نمونه کنترل هیچ ساختار الیاف‌مانندی دیده نمی‌شود، زیرا اساساً در WPI اولیه و دست‌نخورده که فرآیند نشده است، ساختار الیاف وجود ندارد (Serfert *et al.*, 2014).

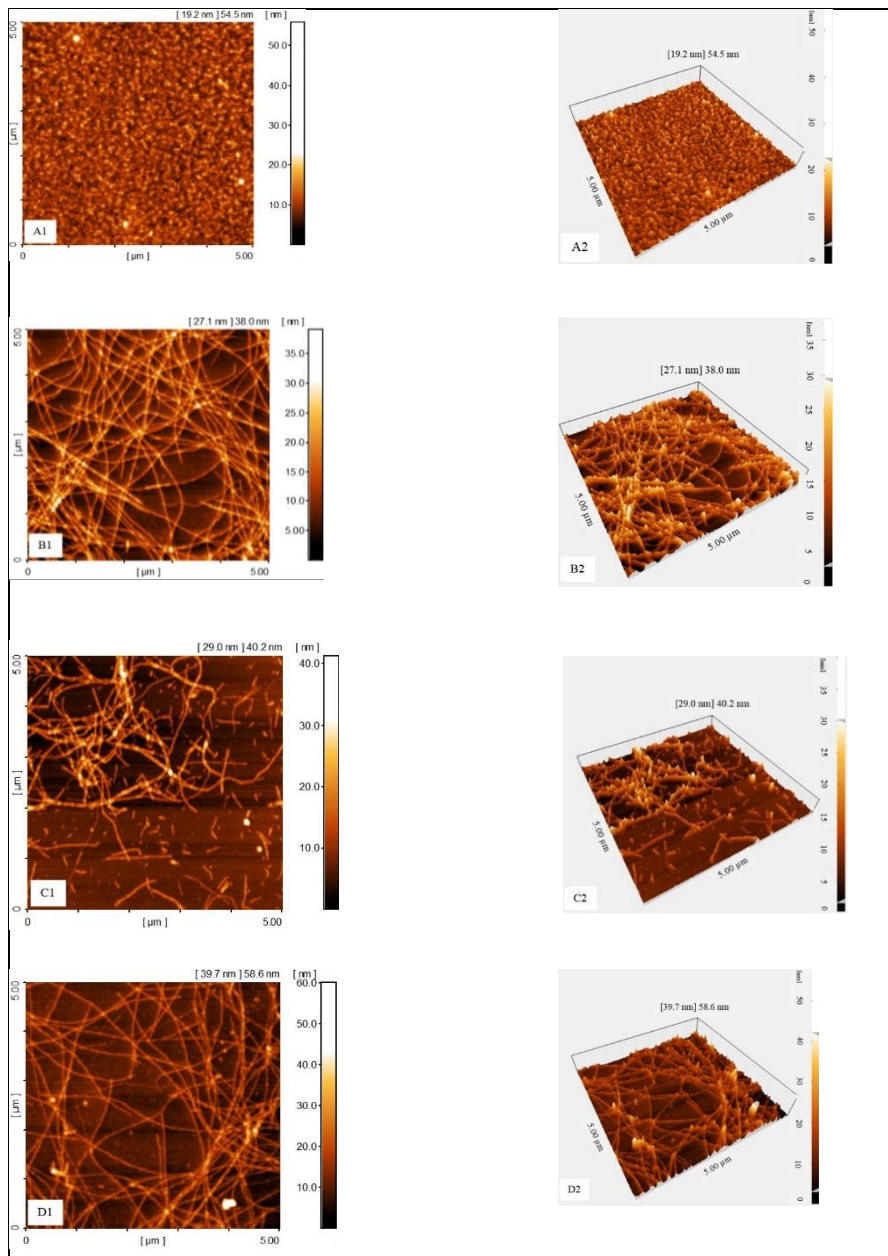
به‌کارگیری فرآیند تشکیل الیاف برای دیسپرسیون اولیه WPI در pH برابر ۲، سبب شکل‌گیری مقادیر قابل توجهی از نانوالیاف شده است. اما پس از تنظیم نهایی pH، میزان حضور و پایداری نانوالیاف دستخوش تغییراتی شده است، به‌گونه‌ای که در pH برابر ۴، میزان نانوالیاف تشکیل شده اولیه کاهش یافته است و در pH برابر ۶، نیز میزان نانوالیاف کمتر از مقدار مشاهده شده در pH برابر ۲ است. به‌عبارت دیگر، میزان پایداری نانوالیاف شکل گرفته، با افزایش pH کاهش قابل توجهی نسبت به pH اولیه داشته است. مطابق با تصویرهای

توپوگرافیک، ساختار میکروسکوپی نمونه‌های نانوالیاف غالباً به شکل الیاف خطی، طویل و مستقیم همراه با برخی الیاف کوتاه‌تر قابل مشاهده است. فرآیند تشکیل الیاف از پروتئین‌های کروی در شرایط کنترل شده طی اعمال فرآیند حرارتی در دمای بالاتر از  $70^{\circ}\text{C}$  به مدت ۲ تا ۲۰ ساعت رخ می‌دهد (Akkermans *et al.*, 2008a; Bolder *et al.*, 2007; van der Linden & Venema, 2007). اما در فرآیندهای حرارتی در دمای بالاتر از  $75^{\circ}\text{C}$  حتی به مدت ۲۰ ساعت نیز امکان تولید صد در صد نانوالیاف وجود ندارد و میزان تبدیل پروتئین به نانوالیاف بین ۴۰ تا ۷۰ درصد است. به این ترتیب، دیسپرسیون‌های حاصل متشکل از مخلوطی از الیاف شکل گرفته طویل و نیمه‌منعطف، برخی الیاف کوتاه‌تر و نیز ساختارهای تجمع نیافته و غیرالیافی است. ضمن آنکه برخی از الیاف کوتاه‌تر، طی ادامه روند فرآیند حرارتی به‌عنوان پیش‌ساز الیاف طویل عمل می‌کنند (Kroes-Nijboer *et al.*, 2012a; Oboroceanu *et al.*, 2011).

pH در شکل‌گیری و پایداری نانوالیاف WPI از مؤلفه‌های مهم است، به‌گونه‌ای که با افزایش pH ساختارهای الیاف کاهش می‌یابد. بالاترین تولید

۱۲ پایداری آنها در pH برابر ۲ مشاهده می‌شود. اما افزایش pH تا محدوده ۴ تا ۶ سبب می‌شود بسیاری از الیاف طویل شکل گرفته شکسته شوند و ساختار میکروسکوپی آنها تا حدودی تغییر کند. ولی این ساختارها در pH های ۲ تا ۳/۵ و ۷ تا

۱۲ پایداری آنها در pH برابر ۲ مشاهده می‌شود. اما افزایش pH تا محدوده ۴ تا ۶ سبب می‌شود بسیاری از الیاف طویل شکل گرفته شکسته شوند و ساختار میکروسکوپی آنها تا حدودی تغییر کند. ولی این ساختارها در pH های ۲ تا ۳/۵ و ۷ تا



شکل ۲- تصویرهای توپوگرافی دوبعدی و سه بعدی به دست آمده از میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) در مقیاس  $5\mu\text{m}$ ، به ترتیب مربوط به نمونه کنترل آب پنیر (A1, A2)، دیسپرسیون نانوالیاف ایزوله پروتئین آب پنیر تهیه شده در pH برابر ۲ (B1, B2)، نمونه نانوالیاف پس از تنظیم در pH برابر ۴ (C1, C2)، نمونه نانوالیاف پس از تنظیم در pH برابر ۶ (D1, D2).

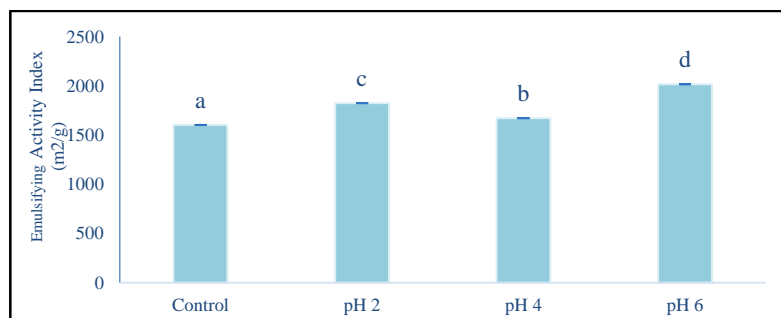




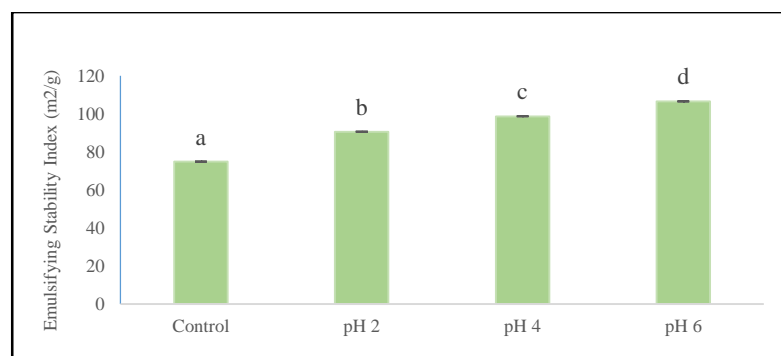
### اندازه‌گیری ظرفیت و پایداری امولسیون نانوالیاف ایزوله پروتئین آب پنیر

موجب افزایش توانایی و ظرفیت پروتئین در قابلیت جذب شدن به گویچه‌های چربی در نواحی سطحی و قابلیت پخش‌پذیری در کل سطح فصل مشترک روغن-آب خواهد شد و به بروز فعالیت امولسیون‌ی بیشتر و افزایش ظرفیت امولسیون‌شوندگی پروتئین منجر می‌شود. ضمن آنکه پایداری در امولسیون نیز افزایش می‌یابد (Pearce & Kinsella, 1978). علاوه بر این، آب‌گریزی سطحی که بر بروز برهم‌کنش‌های پروتئین در فازهای بینابینی روغن-آب تأثیرگذار است و انعطاف‌پذیری مولکولی که بر توانایی باز شدن تاخوردگی‌ها و برقراری برهم‌کنش‌ها با پروتئین‌های دیگر اثر می‌گذارد، تعیین‌کننده ویژگی‌های تشکیل و پایداری امولسیون در پروتئین‌ها هستند (Li et al., 2005).

ظرفیت امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون نمونه‌های نانوالیاف لیوفیلیز شده حاصل از ایزوله پروتئین آب پنیر به ترتیب در شکل‌های ۳ و ۴ ارائه شده است. مشاهده می‌شود که نمونه کنترل به‌طور معنی‌داری کمترین ظرفیت امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون را دارد ( $p < 0.05$ ). اما در نمونه‌های نانوالیاف ظرفیت امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون به‌طور قابل‌توجهی از نمونه کنترل بالاتر است ( $p < 0.05$ ) و نانوالیاف در pH برابر ۶ بیشترین ظرفیت امولسیون‌کنندگی را نشان می‌دهد ( $p < 0.05$ ). به‌طور کلی، باز شدن تاخوردگی‌های پروتئین با دناتوراسیون حرارتی



شکل ۳- ظرفیت امولسیون‌کنندگی نمونه‌های نانوالیاف ایزوله پروتئین آب پنیر پس از تنظیم pH در ۲، ۴ و ۶ و نمونه کنترل. مقادیر نشان‌دهنده انحراف معیار  $\pm$  میانگین با چهار تکرار است. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد است ( $P < 0.05$ ).



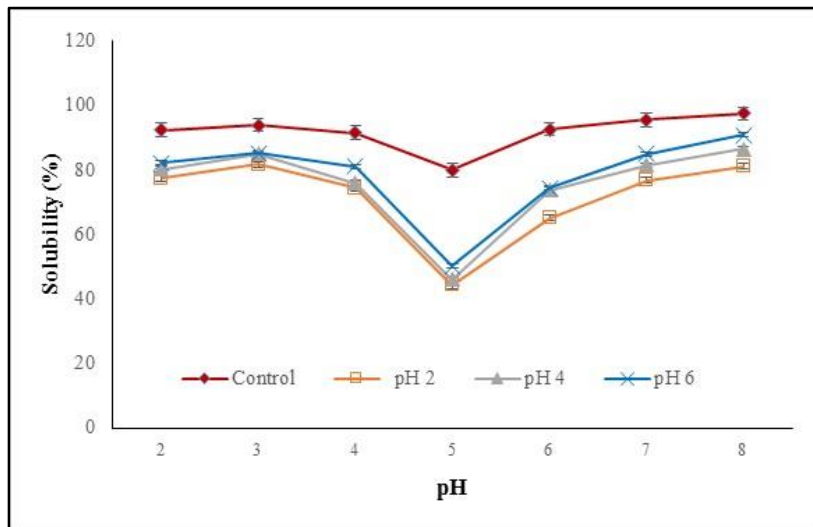
شکل ۴- پایداری امولسیون نمونه‌های نانوالیاف ایزوله پروتئین آب پنیر پس از تنظیم pH در ۲، ۴ و ۶ و نمونه کنترل. مقادیر نشان‌دهنده انحراف معیار  $\pm$  میانگین با چهار تکرار است. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد است ( $P < 0.05$ ).

بین گروه‌های آب‌گریز و آب‌دوست تأثیر می‌گذارد و سبب کاهش واکنش‌پذیری پروتئین با سطح مشترک روغن می‌شود (Kinsella & Morr, 1984; Morr & Ha, 1993). بر پایه نتایج به‌دست‌آمده، تمام نانوالیاف ظرفیت امولسیون‌کنندگی بالاتری دارند که نشان می‌دهد فرآیند تشکیل الیاف بر تولید و پایداری امولسیون نیز تأثیر مثبت و قابل‌توجهی داشته است. لی و همکاران (Li *et al.*, 2005) به وجود آمدن تعادل آمفی‌فیلک مناسب‌تر و جلوگیری از به‌هم‌آمیختگی ذرات روغن ناشی از نیروهای دافعه الکترواستاتیک طی تیمارهای حرارتی WPI را سبب بهبود تولید و پایداری امولسیون می‌دانند. بر پایه تحقیقات سرفرت و همکاران (Serfert *et al.*, 2014)، فعالیت امولسیون‌کنندگی الیاف بتالاکتوگلوبولین نسبت به نمونه کنترل بالاتر بوده است و نیز ذرات چربی در نانوالیاف توزیع قطر کوچک‌تر و مناسب‌تری داشته‌اند که به افزایش پایداری امولسیون منجر می‌شده است. گائو و همکاران (Gao *et al.*, 2017) نشان دادند که نانوالیاف پروتئین بتالاکتوگلوبولین در دامنه‌ای وسیع از pH (۲ تا ۸)، توانایی پایداری امولسیون روغن در آب را دارند و نانوالیاف بتالاکتوگلوبولین در مقایسه با پروتئین آب‌پنیر بهتر بر سطح قطره‌های روغن جذب می‌شوند و امولسیون همگنی تشکیل می‌دهند.

#### اندازه‌گیری درصد انحلال‌پذیری نانوالیاف ایزوله پروتئین آب‌پنیر

شکل ۴ میزان انحلال‌پذیری نمونه‌های نانوالیاف و نمونه کنترل را نشان می‌دهد.

نمونه کنترل به‌عنوان پروتئین کروی دست‌نخورده و فرآیند نشده آب‌پنیر دارای ساختار درهم‌پیچیده و محکمی است که به‌واسطه پنهان ماندن برخی از ساختارهای آب‌دوست و آب‌گریز در بخش‌های درونی، قابلیت جذب آب و واکنش‌دهی نسبتاً کمتری دارد (Damodaran, 2005)، اما در اثر باز شدن تاخوردگی‌های پروتئین طی دناتوراسیون حرارتی، انتهای آب‌گریز و آب‌دوست به شکل دو انتهای دارای بارهای سطحی مخالف هم در مولکول پروتئین‌های کروی در معرض واکنش‌پذیری قرار می‌گیرند. این امر سبب کاهش کشش سطحی و متعاقباً افزایش قابلیت واکنش‌پذیری در پروتئین می‌شود. میزان واکنش‌پذیری WPI تا حدود زیادی به pH نیز بستگی دارد. به‌طور کلی قدرت امولسیون‌کنندگی پروتئین آب‌پنیر و بتالاکتوگلوبولین در pH اسیدی کمتر است که دلیل آن کاهش انعطاف‌پذیری و سفتی بیشتر پروتئین در فصل مشترک امولسیون روغن در آب است (Serfert *et al.*, 2014). در محدوده pH ایزوالکتریک، بارهای سطحی موجود در پروتئین بسیار کاهش می‌یابد و تقریباً به صفر می‌رسد و باعث کاهش تمایل به واکنش‌پذیری در پروتئین می‌شود (Kinsella & Morr, 1984). در نقطه ایزوالکتریک، توده‌های پروتئینی از قبل شکل گرفته بیش از پیش به یکدیگر می‌پیوندند (زیرا نیروهای جاذبه و دافعه قابل‌توجهی وجود ندارند) و در نتیجه توده‌هایی بزرگ‌تر شکل می‌دهند که میزان در معرض قرارگیری گروه‌های آب‌گریز را کاهش می‌دهد و بر تعادل اولیه



شکل ۴- درصد انحلال پذیری نمونه‌های نانوالیاف ایزوله پروتئین آب پنیر پس از تنظیم pH در ۲، ۴ و ۶ و نمونه کنترل. مقادیر نشان دهنده انحراف معیار  $\pm$  میانگین با سه تکرار هستند.

انحلال پذیری بالاتری دیده می‌شود (Kroes- Nijboer *et al.*, 2012a). در pH از ۴ تا ۶، به واسطه کاهش بار سطحی و برهم کنش‌های الکترواستاتیک، واکنش‌های پروتئین-پروتئین افزایش می‌یابد که به کاهش واکنش‌دهی با مولکول‌های آب، تسهیل شکل‌گیری برهم کنش‌های آب‌گریز، بروز توده‌های بزرگ و رسوب یافته و متعاقباً کاهش درصد انحلال پذیری نمونه‌ها منجر می‌شود. از این رو حداقل میزان انحلال پذیری در نمونه‌های نانوالیاف دیده می‌شود (Damodaran, 2005; Kinsella & Morr, 1984). انحلال پذیری به طور ترمودینامیک تحت تأثیر برهم کنش‌های پروتئین/پروتئین و پروتئین/حلال قرار دارد. تعادل آب‌دوست/آب‌گریز بودن که بر میزان آب‌گریزی سطحی پروتئین اثر می‌گذارد نیز بر میزان انحلال پذیری تأثیرگذار است (Damodaran, 2005). محمدیان و ممدلوی (Mohammadian & Madadlou, 2016) و رامبران و سرپل (Rambaran & Serpell, 2008) می‌گویند فرآیند تشکیل الیاف و ساختارهای رشته‌ای نانوالیاف که به طور غالب محتوی ساختارهای صفحات بتا

نمونه کنترل در مقایسه با نمونه‌های نانوالیاف در تمامی نقاط pH، بالاترین میزان انحلال پذیری را نشان می‌دهد ( $p < 0.05$ ). در عین حال، در محدوده pH بالاتر و پایین‌تر از نقطه ایزوالکتریک میزان انحلال پذیری از نقطه ایزوالکتریک بالاتر است. در محدوده pH برابر ۲ تا ۴، انحلال پذیری زیاد و بیشتر از ۹۵ درصد است. در pH برابر ۴ تا ۶ که برای WPI محدوده pH ایزوالکتریک است، انحلال پذیری کاهش یافته و در نقطه ایزوالکتریک تا ۸۰ درصد پایین آمده است. به موازات افزایش pH تا ۸، میزان انحلال پذیری مجدداً افزایش یافته است ( $p < 0.05$ ). برای تمامی نمونه‌های نانوالیاف نیز الگوی مشابهی مشاهده می‌شود ( $p < 0.05$ ). کاهش انحلال پذیری نانوالیاف نشان می‌دهد فرآیند تشکیل الیاف به کاهش انحلال پذیری منجر می‌شود. با توجه به اینکه انحلال پذیری پروتئین در محیط‌های آبی وابسته به pH است، در نانوالیاف WPI در pH بالاتر و پایین‌تر از نقطه ایزوالکتریک، میزان بارهای سطحی مثبت و یا منفی در نانوالیاف حاصل بیشتر است و در نتیجه به واسطه واکنش پذیری بیشتر،

حرارتی بتی—الاکتوگلوبولین و WPI به واسطه در معرض قرارگیری گروه‌های آب‌گریز را دیگر محققان (Jiménez-Castaño *et al.*, 2005; Martínez-Alvarenga *et al.*, 2014) گزارش داده‌اند.

### اندازه‌گیری پارامترهای رنگ نانوالیاف ایزوله پروتئین آب پنیر

اندازه‌گیری مؤلفه‌ها و پارامترهای رنگ‌سنجی نمونه‌های لیوفیلیز شده و دیسپرسیون‌های تازه تهیه شده نانوالیاف حاصل از WPI و نمونه کنترل به ترتیب در جدول‌های ۱ و ۲ ارائه شده‌اند.

هستند، با افزایش آب‌گریزی سطحی سبب کاهش درصد انحلال پذیری می‌شود. با این‌همه، پپتیدهای آزاد و تجمع نیافته‌ای که طی فرآیند تشکیل نانوالیاف به وجود می‌آیند، در کاهش میزان انحلال پذیری محلول‌های نانوالیاف در محدوده نزدیک به نقطه ایزوالکتریک WPI تأثیر دارند و با کاهش درصد انحلال پذیری، در محلول‌های حرارت‌دیده WPI که محتوی نانوالیاف هستند، در محدوده نزدیک به pH برابر ۵ سبب افزایش کدورت در محلول نیز می‌شوند (Kroes-Nijboer *et al.*, 2012a). کاهش انحلال پذیری نانوالیاف حاصل از فرآیند دناتوراسیون

جدول ۱- مؤلفه‌های  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  و پارامترهای رنگ‌سنجی نمونه‌های لیوفیلیز شده نانوالیاف ایزوله پروتئین آب پنیر و نمونه کنترل.

نمونه نانوالیاف	نمونه کنترل	pH ۲/۰ ۹۰ °C	pH ۴/۰ ۹۰ °C	pH ۶/۰ ۹۰ °C
$L^*$	$96/58 \pm 0/51^d$	$81/80 \pm 0/4^a$	$88/84 \pm 0/33^c$	$85/87 \pm 0/69^b$
$a^*$	$0/52 \pm 0/04^a$	$1/75 \pm 0/14^d$	$1/39 \pm 0/01^b$	$1/51 \pm 0/01^c$
$b^*$	$4/75 \pm 0/13^a$	$7/65 \pm 0/17^d$	$6/54 \pm 0/04^{bc}$	$6/74 \pm 0/14^c$
$\Delta E$	-	$16/08 \pm 0/26^c$	$9/91 \pm 0/24^a$	$12/18 \pm 0/57^b$
اندیس سفیدی	$95/52 \pm 0/21^d$	$80/41 \pm 0/37^a$	$86/06 \pm 0/23^c$	$83/08 \pm 0/52^b$

\* اعداد نشان‌دهنده انحراف معیار  $\pm$  میانگین با شش تکرار هستند.  
\* حروف غیرمشابه کوچک در هر ردیف، نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد است ( $P < 0.05$ ).

جدول ۲- مؤلفه‌های  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  و پارامترهای رنگ‌سنجی نمونه‌های دیسپرسیون نانوالیاف ایزوله پروتئین آب پنیر و نمونه کنترل

نمونه نانوالیاف	نمونه کنترل	pH ۲/۰ ۹۰ °C	pH ۴/۰ ۹۰ °C	pH ۶/۰ ۹۰ °C
$L^*$	$75/62 \pm 0/80^d$	$54/54 \pm 0/37^a$	$59/44 \pm 0/32^c$	$56/43 \pm 0/24^b$
$a^*$	$1/61 \pm 0/14^a$	$3/81 \pm 0/03^d$	$3/40 \pm 0/06^{bc}$	$3/59 \pm 0/04^c$
$b^*$	$9/75 \pm 0/10^a$	$14/66 \pm 0/21^d$	$12/91 \pm 0/06^b$	$13/48 \pm 0/07^c$
$\Delta E$	-	$21/75 \pm 0/28^c$	$16/58 \pm 0/25^a$	$19/64 \pm 0/17^b$
اندیس سفیدی	$75/12 \pm 0/40^d$	$54/03 \pm 0/29^a$	$58/79 \pm 0/26^c$	$56/92 \pm 0/19^b$

\* اعداد نشان‌دهنده انحراف معیار  $\pm$  میانگین با شش تکرار هستند.  
\* حروف غیرمشابه کوچک در هر ردیف، نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد است ( $P < 0.05$ ).

به‌طور معنی‌داری بیشترین تمایز رنگ را نشان می‌دهد ( $p < 0.05$ ). در محاسبه فاکتور اندیس سفیدی نیز که نشان‌دهنده تمایل رنگ نمونه‌ها به سفیدی است، نمونه کنترل بیشترین میزان سفیدی را دارد ( $p < 0.05$ ). تغییر در اندیس سفیدی نانوالیاف با تغییرات  $L^*$  برای تمام نمونه‌ها مطابقت دارد.

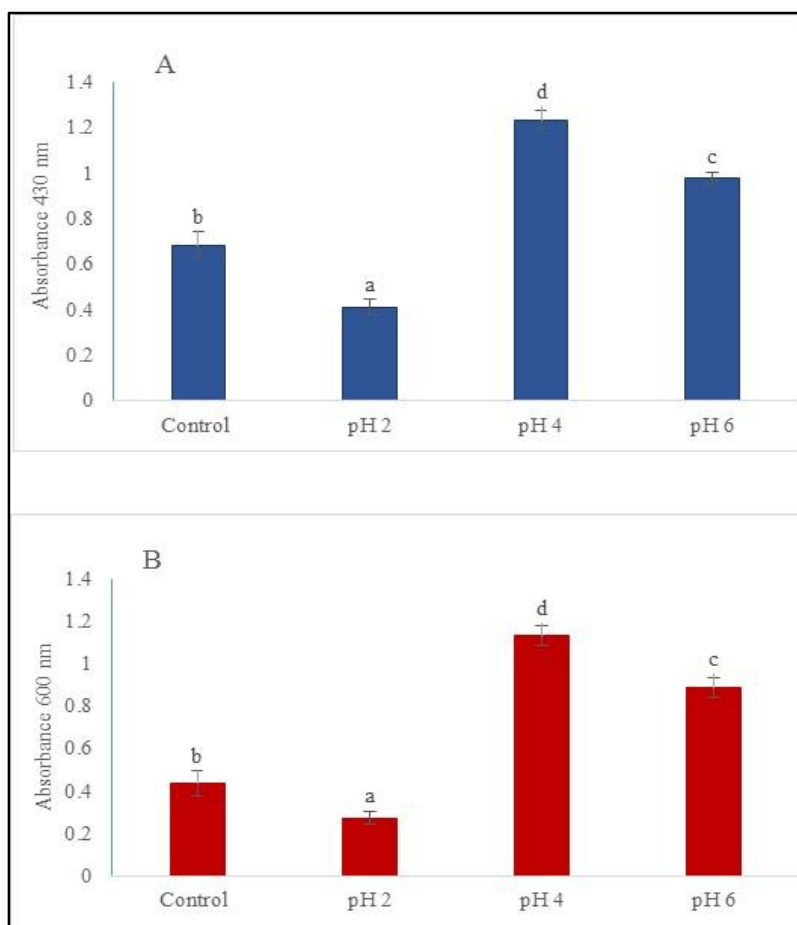
به‌طور کلی بین مقادیر  $a^*$  و  $b^*$  با خواص فیزیکی و ساختار میکروسکوپی WPI ارتباط مشخصی بیان نشده است (Ikeda & Morris, 2002). با این حال، مور و ها (Morr and Ha, 1993) می‌گویند طی دناتوراسیون حرارتی میزان پارامترهای رنگ در دیسپرسیون‌های حاصل از فرآیند حرارتی WPI افزایش می‌یابد. افزایش فاکتور  $L^*$  و اندیس سفیدی نشانه افزایش توده‌های بزرگ در پروتئین است. از این رو، نمونه کنترل بیشترین میزان  $L^*$  و اندیس سفیدی را دارد. در محدوده pH ایزوالکتریک، نبود بارهای سطحی قابل توجه و نبود نیروی جاذبه و دافعه درون مولکولی در پروتئین، باعث افزایش تراکم توده‌های بزرگ و کروی‌شکل در کنار یکدیگر می‌شود (Barbut & Drake, 1997; Cavallieri *et al.*, 2007). ترکیبات بزرگ‌تر نور بیشتری منعکس می‌کنند و بنابراین نمونه‌های پایدار در این محدوده از pH به‌مراتب سفیدتر دیده می‌شوند (Klemaszewski & Kinsella, 1991). در نمونه‌های دارای مقدار نانوالیاف کمتر در pHهای ۴ و ۶، متناسب با تصویرهای دوبعدی و سه‌بعدی حاصل از AFM (شکل ۲) رنگ ظاهری دیسپرسیون سفیدتر و روشن‌تر دیده می‌شود. همچنین، میزان و تراکم نانوالیاف در این محدوده pH نسبت به نمونه در pH برابر ۲ کمتر است که سبب می‌شود میزان سفیدی بیشتر شود.

بین کلیه پارامترهای رنگ هم برای نمونه‌های لیوفیلیز شده و هم برای دیسپرسیون‌های نانوالیاف و نمونه کنترل با یکدیگر اختلاف معنی‌داری وجود دارد ( $p < 0.05$ ). فاکتور  $L^*$  که مؤلفه روشنایی از سیاه به سفید (محدوده صفر تا ۱۰۰) است، در نمونه کنترل لیوفیلیز شده، در مقایسه با نانوالیاف لیوفیلیز شده از همه بیشتر است. در نمونه‌های دیسپرسیون نیز روندی مشابه مشاهده می‌شود و مجدداً فاکتور  $L^*$  در نمونه کنترل دیسپرسیون از دیسپرسیون نانوالیاف بیشتر است ( $p < 0.05$ ). وجود پیتیدهای آزاد و غیرالیافی در نمونه‌های نانوالیاف باعث کاهش روشنایی و تیرگی نمونه‌ها نسبت به پروتئین آب‌پنیر (کنترل) شده است (Kroes- Nijboer *et al.*, 2012b). ضمن آنکه به دلیل رقت بالای دیسپرسیون و محلول بودن آنها، در مقایسه با نمونه‌های خشک شده، فاکتور  $L^*$  در مقادیر بالاتری دیده می‌شود. فاکتور  $a^*$  (از - به + نشان‌دهنده سبز به قرمز) در نمونه کنترل از همه کمتر است و تمایل به سبز به چشم می‌خورد و نانوالیاف تولید و پایدار شده در pH برابر ۲ تا حدودی بیشتر از سایر نمونه‌ها به سمت رنگ قرمز تمایل نشان می‌دهد ( $p < 0.05$ ). در فاکتور  $b^*$  (از - به + نشان‌دهنده آبی به زرد) نیز در نمونه کنترل کمترین تمایل به سمت آبی دارد و با کاهش pH، رنگ نمونه‌ها بیشتر به سمت رنگ زرد متمایل است ( $p < 0.05$ ). در محاسبه  $\Delta E$  که نشان‌دهنده اندازه تفاوت رنگ و تغییر رنگ کل است، نمونه کنترل به‌عنوان نمونه استاندارد در نظر گرفته شد و از این رو فاکتور مذکور برای کنترل محاسبه نشد. فاکتور تغییر رنگ کل نیز در بین نمونه‌های نانوالیاف اختلاف آماری معنی‌دار دارد ( $p < 0.05$ ) و نمونه نانوالیاف پایدار شده در pH برابر ۲

## اندازه‌گیری میزان کدورت و ماتی نانوالیاف ایزوله پروتئین آب‌پنیر

میزان مات بودن و میزان کدورت دیسپرسیون‌های تازه تهیه شده نانوالیاف در شکل ۵ ارائه شده است. از نظر میزان مات بودن و میزان کدورت، تمامی نمونه‌های دیسپرسیون نانوالیاف و نمونه کنترل، به‌طور معنی‌داری با یکدیگر متفاوت‌اند ( $p < 0.05$ ). با تشکیل نانوالیاف، میزان ماتی و میزان کدورت در دیسپرسیون‌ها افزایش یافته است و در نانوالیاف در pH برابر ۲ به‌طور معنی‌داری کمترین میزان مات بودن و کدورت و بیشترین شفافیت دیده می‌شود ( $p < 0.05$ ). نتایج بررسی‌ها نشان می‌دهد مات بودن و کدورت نانوالیاف به pH وابسته است. در دیسپرسیون‌های پروتئینی که ظاهر شفاف‌تری دارند، میزان پیوندهای هیدروژنی و برهم‌کنش‌های آب‌گریز بسیار غالب‌تر است. همچنین، به‌کارگیری فرآیندهای حرارتی با دمای بالاتر نیز به بروز دناتوراسیون بیشتر و بروز ماتی و کدورت بالاتر در نمونه‌های نانوالیاف تشکیل شده منجر می‌شود (Kinsella & Morr, 1984). به‌این ترتیب، در دیسپرسیون‌های دارای الیاف بیشتر (مطابق با نتایج حاصل از AFM)، به‌واسطه غالب بودن پیوندهای هیدروژنی و آب‌گریز که از ضرورت‌های تشکیل ساختارهای الیاف به شمار می‌روند، دیسپرسیون‌هایی با ظاهر شفاف‌تر و ماتی و کدورت کمتر در نانوالیاف در pH برابر ۲ نسبت به سایر نمونه‌ها دیده می‌شود. یافته‌های آکرمانس و همکاران (Akkermans, 2008b) نشان می‌دهد نانوالیاف WPI در pH‌های ۳/۵ و کمتر،

دیسپرسیون‌های شفاف تشکیل می‌دهد و با افزایش pH در محدوده ۷/۵، دیسپرسیون‌های نانوالیاف تشکیل شده سفیدتر و با میزان ماتی و کدورت بیشتری تشکیل می‌شوند. برخی محققان (Oboroceanu *et al.*, 2011) نشان داده‌اند در نانوالیاف با افزایش مقادیر pH از ۲ به سمت محدوده نزدیک به نقطه ایزوالکتریک (۴-۶)، میزان مات بودن افزایش می‌یابد. برخی دیگر (Kroes- Nijboer *et al.*, 2012b) دریافته‌اند دیسپرسیون‌های نانوالیاف آب‌پنیر در pH برابر ۲ به‌واسطه بالا بودن ساختارهای الیاف در دیسپرسیون ظاهر شفاف‌تری دارند، در محدوده pH برابر ۵ مات و کدر هستند و با افزایش pH به بالاتر از ۸ مجدداً شفاف هستند که به‌واسطه وجود مقادیر بیشتری از پپتیدهایی است که به شکل ساختارهای غیرالیافی در دیسپرسیون حضور دارند. در pH‌های پایین‌تر و بالاتر از ایزوالکتریک، به‌واسطه دناتوراسیون حرارتی میزان توده‌های کروی و بزرگ پروتئینی کاهش می‌یابد، اما در محدوده نزدیک به ایزوالکتریک، به سبب صفر بودن بارهای سطحی و کاهش نیروهای جاذبه و دافعه بین‌مولکولی و درون‌مولکولی، تراکم توده‌های پروتئینی در کنار یکدیگر افزایش می‌یابد و کدورت و ماتی بیشتری دیده می‌شود (Barbut & Drake, 2007; Cavallieri *et al.*, 1997). در توضیح علت بروز شفافیت در نانوالیاف پایدار شده در pH برابر ۲، علاوه بر دلایل فوق، وجود پیوند هیدروژنی و واکنش‌های آب‌گریز و درعین حال وجود ساختارهای پروتئینی رشته‌ای و الیاف‌مانند دخیل است (Ikeda & Morris, 2002).



شکل ۵- میزان مات بودن (A) و میزان کدورت (B) دیسپرسیون‌های نانوالیاف

ایزوله پروتئین آب پنیر پس از تنظیم pH در ۲، ۴ و ۶ و نمونه کنترل.

مقادیر نشان‌دهنده انحراف معیار  $\pm$  میانگین با شش تکرار هستند. حروف غیرمشابه، نشان‌دهنده

اختلاف معنی‌دار آماری به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد است ( $P < 0.05$ ).

## نتیجه‌گیری

بنابراین از آنجایی که pH بسیاری از محصولات غذایی بین ۴ تا ۷ است، با توجه به پایداری و ویژگی‌های عملکردی مطلوب الیاف تولیدشده در محدوده مختلف pH، می‌توان بسیاری از ویژگی‌های فیزیکی، ساختاری و عملکردی محصولات غذایی را با استفاده از نانوالیاف به‌عنوان ترکیبات افزودنی بهبود بخشید.

نتایج بررسی حاضر نشان می‌دهد در دمای بالا و pH پایین، علاوه بر تولید مطلوب نانوالیاف حاصل از ایزوله پروتئین آب پنیر، پایداری ساختاری نانوالیاف تولیدشده نیز بیشتر است. ضمن آنکه نانوالیاف حاصل در مقایسه با پروتئین آب پنیر فرآیند نشده، ویژگی‌های ساختاری و عملکردی بسیار بهتری دارند.

## تشکر و قدردانی

از مؤسسه تحقیقات فنی و مهندسی کشاورزی برای تأمین بخشی از هزینه‌ها و در اختیار قرار دادن امکانات اجرای پروژه تشکر و قدردانی می‌شود.

## تعارض منافع

نویسندگان در رابطه با انتشار مقاله ارائه شده به طور کامل از اخلاق نشر، از جمله سرقت ادبی، سوء رفتار، جعل داده‌ها و یا ارسال و انتشار دوگانه، پرهیز نموده‌اند و منافعی تجاری در این راستا وجود ندارد.

## مراجع

- Akkermans, C., Goot, A., Venema, P., Gruppen, H. and Linden, E. 2008a. Peptides are building blocks of heat induced fibrillar protein aggregates of  $\beta$ -lactoglobulin at pH 2.0. *Biomacromol.* 10, 142-154.
- Akkermans, C., Goot, A., Venema, P., van der Linden, E. and Boom, R. M. 2008b. Formation of fibrillar whey protein aggregates: Influence of heat and shear treatment, and resulting rheology. *Food Hydrocoll.* 22, 1315-1325.
- Barbut, S. and Drake, D. 1997. Effect of reheating on sodium-induced cold gelation of whey proteins. *Food Res. Int.* 30, 153-157.
- Bolder, S. G., Vasbinder, A. J., Sagis, L. M. C. and van der Linden, E. 2007. Heat-induced whey protein isolate fibrils: Conversion, hydrolysis, and disulphide bond formation. *Int. Dairy J.* 17, 846-853.
- Bradford, M. M. 1979. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Bryant, C. M. and McClements, D.J. 1999. Ultrasonic spectrometry study of the influence of temperature on whey protein aggregation. *Food Hydrocoll.* 13, 439-444.
- Cavallieri, A. L. F., Costa-Netto, A. P., Menossi, M. and da Cunha, R. L. 2007. Whey protein interactions in acidic cold-set gels at different pH values. *Le Lait j. EDP Sci.* 87, 535-554.
- Damodaran, S. 2005. Protein stabilization of emulsions and foams. *J. Food Sci.* 70, 54-66.
- Denkov, N.D. 2004. Mechanisms of foam destruction by oil-based antifoams. *Langmuir.* 20, 9463-9505.
- Gao, Z., Zhao, J., Huang, Y., Yao, X., Zhang, K., Fang, Y., Nishinari, K., Philips, G. O., Jiang, F. and Yang, H. 2017. Edible pickering emulsion stabilized by protein fibrils. Part1: Effects of pH and fibrils concentration. *LWT-Food Sci Technol.* 76, 1-8.
- Ikeda, S. and Morris, V. J. 2002. Fine-Stranded and Particulate Aggregates of Heat-Denatured Whey Proteins Visualized by Atomic Force Microscopy. *Biomacromolecules.* 3, 382-389.
- Jagtap, R. N. and Ambre, A. H. 2006. Overview literature on atomic force microscopy (AFM): Basics and its important applications for polymer characterization. *Ind. J. Eng. Mat. Sci.* 13, 368-384.
- Jiménez-Castaño, L., López-Fandiño, R., Olano, A. and Villamiel, M. 2005. Study on  $\beta$ -lactoglobulin glycosylation with dextran: effect on solubility and heat stability. *Food Chem.* 93, 689-695.



- Jones, O., Andrew, E. D. and McClements, D. 2010. Thermal analysis of  $\beta$ -lactoglobulin complexes with pectins or carrageenan for production of stable biopolymer particles. *Food Hydrocoll.* 24, 239-248.
- Kinsella, J. E. and Morr, C. V. 1984. Milk proteins: Physicochemical and functional properties. *CRC Critic. Rev. Food Sci. Nut.* 21, 197-262.
- Klemaszewski, J. L. and Kinsella, J. E. 1991. Sulfitolysis of whey proteins: Effects of emulsion properties. *J. Agric. Food Chem.* 39, 1033-1036.
- Komsa-Penkova, R., Koynova, R., Kostov, G. and Tenchov, B. G. 1996. Thermal stability of calf skin collagen type I in salt solutions. *Biochim. et Biophys. Acta.* 1297, 171-181.
- Kroes-Nijboer, A., Venema, P. and van der Linden, E. 2012a. Fibrillar structures in food. *Food. Func.* 3, 221-227.
- Kroes-Nijboer, A., Sawalha, H., Venema, P., Bot, A., Floter, E., den Adel, R., Bouwman, W. C., and van der Linden, E. 2012b. Stability of aqueous food grade fibrillar systems against pH change. *Faraday Disc.* 158, 125-138.
- Li, C. P., Enomoto, H., Ohki, S., Ohtomo, H. and Aoki, T. 2005. Improvement of functional properties of whey protein isolate through glycation and phosphorylation by dry heating. *J. Dairy Sci.* 88, 4137-4145.
- Loveday, S. M., Su, J., Rao, M. A., Anema, S. G. and Singh, H. 2012b. Whey protein nanofibrils: The environment-morphology-functionality relationship in lyophilization, rehydration, and seeding. *J. Agri. Food Chem.* 60, 5229-5236.
- Mantovani, R. A., Fattori, J., Michelon, M. and Cunha, R. L. 2016. Formation and pH-stability of whey protein fibrils in the presence of Lecithin. *Food Hydrocoll.* 60, 288-298.
- Martinez-Alvarenga, M. S., Martinez-Rodriguez, E. Y., Garcia-Amezquita, L. E., Olivas, G. I., Zamudio-Flores, P. B., Acosta-Muniz, C. H. and Sepulveda, D. R. 2014. Effect of Maillard reaction conditions on the degree of glycation and functional properties of whey protein isolate - Maltodextrin conjugates. *Food Hydrocoll.* 38, 110-118.
- McCrae, C. H., Law, A. J. R. and Leaver, J. 1999. Emulsification properties of whey proteins in their natural environment: effect of whey protein concentration at 4 and 18% milk fat. *Food Hydrocoll.* 389-399.
- Mohammadian, M. and Madadlou, A. 2016. Characterization of fibrillated antioxidant whey protein hydrolysate and comparison with fibrillated protein solution. *Food Hydrocoll.* 52, 221-230.
- Morr, C. V. and Ha, E. Y. W. 1993. Whey protein concentrates and isolates: Processing and functional properties. *Critic. Rev. Food Sci. Nut.* 33, 431-476.
- Oborocanu, D., Wang, L., Kroes-Nijboer, A., Brodkorb, A., Venema, P., Magner, E. and Auty, M. A. E. 2011. The effect of high pressure microfluidization on the structure and length distribution of whey protein fibrils. *Int. Dairy J.* 21, 823-830.

- Oboroceanu, D., Wang, L., Magner, E. and Auty, M. A. E. 2014. Fibrillization of whey proteins improves foaming capacity and foam stability at low protein concentrations. *J. Food Eng.* 121, 102–111.
- Pearce, K. N. and Kinsella, J. E. 1978. Emulsifying Properties of Proteins: Evaluation of a Turbidimetric Technique. *J. Agri. Food Chem.* 26, 716-723.
- Rambaran, R. N. and Serpell, L. 2008. Amyloid fibrils: Abnormal protein assembly. *Prion.* 2, 12–17.
- Rao, M., Loveday, S., Creemer, L. and Singh, H. 2009. Factors affecting rheological characteristics of fibril gels: the case of  $\beta$ -lactoglobulin and alpha-lactalbumin. *J. Food Sci.* 74(3), 47-55.
- Serfert, Y., Lamprecht, C., Tan, C. P., Keppler, J. K., Appel, E., Rossier-Miranda, F. J., Schroen, K., Boom, R. M., Gorb, S., Selhuber-Unkel, C., Drusch, S. and Schwarz, K. 2014. Characterisation and use of  $\beta$ -lactoglobulin fibrils for microencapsulation of lipophilic ingredients and oxidative stability thereof. *J. Food Eng.* 143, 53–61.
- van der Linden, E. and Venema, P. 2007. Self-assembly and aggregation of proteins. *COCIS.* 12, 158–165.

## Stability of whey protein nanofibrils at different pH

F. Farrokhi, F. Badii\*, M. R. Ehsani, M. Hashemi

\* Corresponding Author: Associate Professor, Agricultural Engineering Research Institute (AERI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Email: f.badii@areeo.ac.ir

Received: 26 July 2019, Accepted: 21 April 2020

<http://doi: 10.22092/fooder.2020.127218.1233>

### Abstract

Protein nanofibers are obtained through heating the globular proteins above their denaturation temperatures at acidic pH. These structures have a length of about 1  $\mu\text{m}$  and a diameter of about 1 to 10 nm and are very anisotropic. The main objective of this study was to produce nanofibrils from whey protein isolates, evaluate their appearance and functional properties in order to use them as ingredients in food.

The protein nanofibrils were prepared at 90 °C at the concentration of 20 mg mL<sup>-1</sup> then their appearance and functional properties were evaluated at pH 2, 4, and 6. The results obtained by atomic force microscopy showed that by increasing pH, the stability and the content of the produced nanofibrils decreased. Moreover, stable nanofibrils at higher pH values showed higher emulsion capacity and stability and higher solubility percentages. Also by increasing pH, samples opacity and turbidity and color parameters were increased. Nanofibrils also showed better functional properties compared to the control sample ( $P < 0.05$ ). In this way, protein nanofibrils can be commercially suggested as an additive to improve functional properties of food products. Desirable functional characteristics of WPI nanofibrils compared to the unprocessed native whey protein isolate, provides the possibility of their application to improve the qualitative properties of food products and as ingredients in foods for patients and elderly people and dietary and low-calorie foods.

**Key Words:** Atomic Force Microscopy, Emulsion Capacity, Protein Nanofibril, Solubility, Whey Protein Isolation.