

آماده انتشار

ارزیابی ویژگی‌های ساختاری و عملکردی کونژوگه‌های ایزوله پروتئین دانه کدو (*Cucurbita pepo*) – صمغ

فارسی

مهديه اکبري دانشجوی دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

Mahdiah Akbari, Ph.D. Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Food Industries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

مهران اعلمی، استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

Mehran Aalami, Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Food Industries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

یحیی مقصودلو، استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

Yahya Maghsoudlou, Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Food Industries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

هدی شهیری طبرستانی، دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

Hoda Shahiri Tabarestani, Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Food Industries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

سابقه و هدف: پروتئین‌های گیاهی عمدتاً از نوع پروتئین‌های ذخیره‌ای کروی با وزن مولکولی بالا هستند. استفاده از این پروتئین‌ها در فرمولاسیون محصولات غذایی به دلیل ساختار سخت و انعطاف‌ناپذیر آنها، با محدودیت‌هایی از جمله حلالیت پایین، قابلیت امولسیون‌کنندگی و کف‌کنندگی ضعیف همراه است. در همین راستا، توسعه روش‌های کارآمد جهت اصلاح ساختار پروتئین‌های گیاهی به منظور بهبود عملکرد و گسترش کاربردهای صنعتی ضروری به نظر می‌رسد. در سال‌های اخیر، واکنش میلارد به عنوان روشی طبیعی و ایمن برای کونژوگه کردن پروتئین با کربوهیدرات با هدف اصلاح ساختار پروتئین‌ها بسیار مورد توجه قرار گرفته است. این روش بدون نیاز به افزودن ترکیبات شیمیایی و در شرایط کنترل شده رخ می‌دهد. پژوهش حاضر با هدف تهیه و بررسی ساختار و ویژگی‌های عملکردی کونژوگه‌های ایزوله پروتئین دانه کدو و بخش محلول صمغ فارسی در نسبت‌های مختلف (۱ به ۱)، (۱ به ۳) و (۳ به ۱) انجام شده است. نتایج این مطالعه می‌تواند به توسعه ترکیبات عملکردی جدید با کاربردهای گسترده در صنایع غذایی منجر شود.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق تولید کونژوگه‌های ایزوله پروتئین دانه کدو- بخش محلول صمغ فارسی به روش حرارت‌دهی خشک در دمای ۶۰ درجه‌سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۷۵ درصد در نسبت‌های صمغ به پروتئین (۱ به ۱)، (۱ به ۳) و (۳ به ۱) به مدت ۴۸ ساعت انجام شد. به منظور ارزیابی میزان پیشرفت فرایند تشکیل کونژوگه طی واکنش میلارد، درصد کونژوگه‌شدن و جایگزینی گروه‌های آمین آزاد پروتئین به روش اورتو-فتال دی‌آلدهید (OPA) اندازه‌گیری شد. در همین راستا طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR)، الکتروفورز ژل پلی‌اکریل آمید (SDS-PAGE) به منظور تایید واکنش میلارد انجام شد و همچنین شاخص‌های رنگی، ویژگی‌های امولسیون‌کنندگی (شاخص فعالیت امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون)، اندازه ذرات، پتانسیل زتا امولسیون و ویژگی‌های کف‌کنندگی (شاخص ظرفیت کف‌کنندگی و پایداری کف) مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: برهمکنش کووالانسی ایزوله پروتئین دانه کدو- بخش محلول صمغ فارسی طی واکنش میلارد با استفاده از روش OPA، طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR) و نیز پروفایل الکتروفورز تایید شد. بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش، بیشترین میزان پتانسیل زتا (mV) 0.81 ± 41.35 ، فعالیت امولسیون‌کنندگی (0.18 ± 14.19)، پایداری امولسیون (1.52 ± 67.57 درصد)، ظرفیت کف‌کنندگی (0.23 ± 36.23 درصد) و نیز پایداری کف (1.01 ± 27.53 درصد) برای نسبت (۳ به ۱) ایزوله پروتئین دانه کدو- بخش محلول صمغ فارسی تعیین شد ($p \leq 0.05$) که با نتایج درجه کونژوگه‌شدن در نسبت ذکرشده هم راستا بود. به طور کلی نتایج حاصل از ارزیابی‌های مختلف نشان داد، کونژوگه‌های تولیدشده در مقایسه با پروتئین، ویژگی‌های عملکردی بهتری را به نمایش می‌گذارند.

نتیجه‌گیری: کونژوگه شدن ایزوله پروتئین دانه کدو با بخش محلول صمغ فارسی منجر به بهبود ویژگی‌های امولسیون‌کنندگی، کف‌کنندگی و نیز تغییر چشمگیر در اندازه ذرات و پتانسیل زتا امولسیون تولیدی در مقایسه با پروتئین به تنهایی می‌گردد. این فرایند منجر به تولید ساختارهای با ویژگی‌های عملکردی بهبودیافته می‌شود که می‌توان از آن به عنوان بخشی از فرمولاسیون در طیف گسترده‌ای از فراورده‌های غذایی از جمله، نوشیدنی‌ها، محصولات نانوائی و فراورده‌های لبنی استفاده نمود.

کلمات کلیدی: واکنش میلارد، صمغ فارسی، ایزوله پروتئین دانه کدو، ویژگی‌های عملکردی، کونژوگه

مقدمه

در سال‌های اخیر دانه کدو (*Cucurbita pepo*) به عنوان یک دانه روغنی به دلیل مقادیر بالای اسیدهای چرب غیر اشباع و سایر ترکیبات زیست‌فعال موجود در آن، بسیار مورد توجه قرار گرفته است. با توجه به تولید روزافزون روغن از این دانه، بخش قابل توجهی ضایعات با ارزش تغذیه‌ای بالا تولید می‌شود که حاوی ۶۵-۶۰ درصد پروتئین است. این پروتئین را می‌توان به ترکیباتی با ارزش افزوده از جمله کنسانتره و ایزوله پروتئین تبدیل کرده و از آن به عنوان اجزای فرمولاسیون فراورده‌های فراسودمند یا مکمل تغذیه‌ای در محصولات مختلف مورد استفاده قرار داد (۱). جزء پروتئینی اصلی موجود در دانه کدو، پروتئین‌های ذخیره‌ای گیاهی از نوع گلوبولین‌های ۱۲S هستند که در این دانه با عنوان کوکوروبیتین‌ها شناخته می‌شوند. کوکوروبیتین‌ها به همراه آلومین‌های ۲S، حدود ۵۹ درصد از کل محتوای پروتئینی دانه کدو را تشکیل می‌دهند (۲). پروتئین‌ها در ساختارهای غذایی توسط عواملی نظیر pH، دما و قدرت یونی تحت تاثیر قرار می‌گیرند. علاوه بر این، پروتئین‌های گیاهی که به عنوان ذخایر تغذیه‌ای برای رشد گیاه عمل می‌کنند، عمدتاً از نوع پروتئین‌های ذخیره‌ای کرووی با وزن مولکولی بالا هستند. این ساختار سخت و انعطاف‌ناپذیر، منجر به

حلالیت پایین و ویژگی‌های امولسیون‌کنندگی و کف‌کنندگی ضعیف و نیز پایداری کف بسیار محدود می‌گردد (۳،۴). بنابراین توسعه روش‌های مؤثر اصلاح ساختار پروتئین با هدف افزایش انعطاف‌پذیری و نیز بهبود ویژگی‌های عملکردی آن‌ها، به منظور گسترش دامنه کاربردهایشان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۵). در سال‌های اخیر، پژوهش‌های متعددی با هدف بهبود ویژگی‌های عملکردی پروتئین‌ها از طریق کونژوگ کردن آن‌ها با کربوهیدرات‌ها طی واکنش میلارد صورت گرفته است. واکنش میلارد به‌طور طبیعی و بدون نیاز به افزودن ترکیبات شیمیایی، در شرایط کنترل‌شده از نظر دما، زمان، رطوبت و pH رخ می‌دهد (۶). گلیکوزیلاسیون عمدتاً به مرحله آغازین واکنش میلارد اطلاق می‌شود که طی آن، کونژوگ‌های پروتئین-کربوهیدرات تشکیل شده و ویژگی‌های عملکردی پروتئین‌ها دستخوش تغییر می‌گردد (۷). در نتیجه این امر، نه تنها ویژگی‌های عملکردی پروتئین حفظ می‌شود، بلکه در ترکیب با پلی‌ساکاریدها نیز بهبود می‌یابد. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که تشکیل گلیکوپروتئین‌ها منجر به افزایش حلالیت، مقاومت حرارتی، بهبود ویژگی‌های امولسیون‌کنندگی، کف‌کنندگی، ضد میکروبی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها می‌شود (۸). به‌طور کلی، کربوهیدرات‌های مورد استفاده در فرآیند گلیکوزیلاسیون پروتئین‌ها شامل مونوساکاریدها، دی‌ساکاریدها، الیگوساکاریدها و پلی‌ساکاریدها هستند. مطالعات نشان داده‌اند که در مقایسه با کونژوگ‌های حاصل از مونوساکاریدها، دی‌ساکاریدها و الیگوساکاریدها، گلیکوزیلاسیون پروتئین‌ها با پلی‌ساکاریدها منجر به تشکیل ساختارهایی با ویژگی‌های عملکردی بهبودیافته می‌شود (۹). صمغ بادام تلخ که با نام‌های محلی صمغ فارسی، شیرازی، زرد و انگوم نیز شناخته می‌شود، در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. این صمغ، ترش‌حی طبیعی از درخت بادام کوهی (*Amygdalus scoparia Spach*) است که به‌صورت خودرو در ایران و برخی کشورهای خاورمیانه رشد می‌کند (۱۰).

صمغ فارسی پلی‌ساکاریدی آنبونی متشکل از دو جز محلول و نامحلول در آب است. بخش محلول صمغ فارسی به راحتی در آب سرد حل می‌شود، در صورتی که بخش نامحلول آن به صورت جزئی در آب با دماهای بالا قابلیت انحلال دارد (۱۱). بخش محلول به دلیل دارا بودن مقدار مقادیر اندک پروتئین، ویژگی‌های امولسیون‌کنندگی مطلوبی از خود نشان می‌دهد، در حالی که بخش نامحلول، به دلیل محتوای کربوهیدراتی بالاتر، از قابلیت قوام‌دهندگی بالاتری برخوردار است (۱۲). در پژوهش‌های مختلف گزارش شده است که تشکیل کونژوگ‌های پروتئین با صمغ فارسی و یا بخش محلول صمغ فارسی منجر به بهبود خصوصیات عملکردی پروتئین می‌شود. به عنوان مثال، قان‌دی و حسینی (۲۰۲۱)، گزارش کردند، امولسیون‌های تهیه شده در نتیجه افزودن کونژوگ‌های ایزوله پروتئین سویا-صمغ فارسی در مقایسه با ایزوله پروتئین به تنهایی به واسطه شکل‌گیری قطرات روغن با اندازه کوچکتر و محیطی با ویسکوزیته بالاتر، پایداری فیزیکی بیشتری را نیز نشان دادند (۱۳). حسینی و همکاران (۲۰۲۳) نیز گزارش کردند شکل‌گیری کونژوگ‌های سدیم کازئینات-بخش محلول صمغ فارسی طی واکنش میلارد منجر به بهبود پایداری حرارتی، خصوصیات کف‌سازی و امولسیون‌کنندگی می‌گردد (۱۴). در پژوهشی تشکیل کونژوگ‌های ژلاتین ماهی-بخش محلول صمغ فارسی در نسبت‌های مختلف با استفاده از طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه و تعیین درجه کونژوگ‌شدن تایید شد. در این بررسی گزارش شد فرایند تشکیل کونژوگ منجر به بهبود خصوصیات کف‌سازی و امولسیون‌کنندگی می‌گردد (۱۵). بنابراین با توجه به اینکه تاکنون مطالعه‌ای در زمینه ارزیابی ویژگی‌های ساختاری و عملکردی کونژوگ‌های حاصل از ایزوله پروتئین دانه کدو و بخش محلول صمغ فارسی انجام نشده است، هدف از این پژوهش مطالعه ساختار کونژوگ‌های ایزوله پروتئین دانه کدو-

بخش محلول صمغ فارسی در نسبت‌های مختلف و نیز ارزیابی ویژگی‌های عملکردی آن می‌باشد. انتظار می‌رود نتایج حاصل از این پژوهش به معرفی کونژوگه‌ای با ساختار و عملکرد بهینه منجر شود.

مواد و روش‌ها

دانه کدو از شرکت پاکان بذر اصفهان و صمغ فارسی از شرکت ریحان گام پارسین و روغن آفتابگردان با نام تجاری اوپلا از بازار محلی خریداری شد. دی سدیم هیدروژن فسفات، سدیم هیدروژن فسفات، سدیم کلرید، سدیم هیدروکسید، اورتوفتال دی آلدهید (OPA)، سدیم دو دیل سولفات، متانول، هگزان و سایر مواد شیمیایی از شرکت مرک تهیه گردید.

استخراج بخش محلول صمغ فارسی

بخش محلول صمغ فارسی به روش عباسی و محمدی (۲۰۱۳)، استخراج شد. برای این منظور صمغ فارسی پودر و الک‌شده در غلظت ۳ درصد وزنی-حجمی، به آب مقطر در حال هم خوردن افزوده شد. سپس دیسپرسیون تهیه شده به مدت ۳۰ دقیقه در بن-ماری با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از آن به منظور آب‌گیری کامل به مدت یک شب در دمای محیط نگهداری و سپس بخش محلول صمغ یا سوپرناتانت با استفاده از سانتریفیوژ با دور $8000 \times g$ در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه جداسازی شد (۱۰).

تهیه ایزوله پروتئین دانه کدو

دانه کدو به روش پرس سرد روغن‌گیری شد و سپس کنجاله حاصل از روغن‌کشی دانه کدو آسیاب و تبدیل به آرد شد. به منظور تهیه ایزوله پروتئینی ابتدا کنجاله با هدف چربی زدایی به نسبت ۱ به ۵ (برای دو مرحله) با هگزان مخلوط شد. پس از چربی‌زدایی به منظور خروج حلال، در معرض هوا قرار گرفت تا حلال اضافی با جریان هوا در دمای محیط خارج شود. سپس کنجاله چربی-گیری شده در محلول قلیایی با pH برابر با ۱۰ (تنظیم pH با استفاده از محلول سدیم هیدروکسید ۱ مولار) در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه بر روی همزن مغناطیسی به منظور حلالیت پروتئین، هم‌زده شد. سپس سوپرناتانت با استفاده از سانتریفیوژ با دور $g \times 4669$ در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه جداسازی شد. در ادامه پروتئین محلول در سوپرناتانت با تنظیم pH در محدوده ۴/۵ (با استفاده از اسید کلریدریک ۱ مولار) رسوب داده شد و سپس با استفاده از سانتریفیوژ با دور $g \times 4669$ در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه جداسازی شد. ایزوله پروتئین حاصل با آب مقطر شستشو داده شد و سپس با استفاده از خشک‌کن انجمادی (Operon, Korea) خشک شد (۱۶).

تهیه کونژوگه‌های صمغ فارسی-ایزوله پروتئین دانه کدو

محلول بافر فسفات (0.1 M , pH = ۸/۵) به پودر ایزوله پروتئین دانه کدو (PPI) و بخش محلول صمغ فارسی (SFPG) با غلظت ۳ درصد وزنی-حجمی از دو بیوپلیمر، با نسبت‌های مختلف (۱ به ۱)، (۱ به ۳) و (۳ به ۱) پروتئین به صمغ، افزوده شد و به مدت یک ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بر روی همزن مغناطیسی هم زده شد. سپس به منظور آب‌گیری کامل به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از طی این مدت، محلول با استفاده از خشک‌کن انجمادی به طور کامل

خشک شد و تا زمان قرار دادن در شرایط تشکیل کونژوگه در فریزر نگهداری شد. به منظور تشکیل کونژوگه‌ها، پودرهای بدست آمده از مرحله قبل در پلیت‌های شیشه‌ای در دسیکاتور حاوی محلول سدیم کلرید اشباع (رطوبت نسبی ۷۵ درصد) چیده شد و برای مدت زمان ۲ روز در داخل انکوباتور با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۳). پروتئین در شرایط مشابه به عنوان نمونه کنترل در نظر گرفته شد. پودرهای حاصل جهت انجام آنالیزهای بعدی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

درصد کونژوگه‌شدن

میزان گلیکوزیلاسیون کونژوگه‌های PPI-SFPG و PPI با استفاده از روش اورتو-فتال‌دی‌آلدهید (OPA) و با اندکی اصلاح اندازه‌گیری شد. به طور خلاصه، محلولی حاوی ۴۰ میلی‌گرم OPA در ۱ میلی‌لیتر اتانول تهیه شد و با ۲/۵ میلی‌لیتر سدیم دودسیل سولفات ۲۰ درصد وزنی-حجمی و ۱۰۰ میکرولیتر بتامرکاپتواتانول مخلوط گردید. سپس حجم نهایی محلول با استفاده از بافر بوراکس ۰/۱ مولار (pH = ۸/۵) به ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد. در مرحله بعد، ۵۰ میکرولیتر از محلول نمونه با ۲ میلی‌لیتر از معرف OPA مخلوط گردید و پس از ۳۰ دقیقه انکوبه کردن در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، جذب آن در طول موج ۳۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (۱۷).

درجه کونژوگه‌شدن طبق رابطه (۱) محاسبه گردید:

$$\text{درجه کونژوگه‌شدن} = (A_0 - A_t) / A_0 \times 100$$

در این رابطه A_0 و A_t به ترتیب نشان‌دهنده جذب نمونه‌ها قبل و بعد از تیمار می‌باشند.

الکتروفورز SDS-PAGE

الکتروفورز ژل اکریل‌آمید SDS-PAGE تحت شرایط احیا کننده مطابق روش لاملی (۱۹۷۰) انجام گرفت. برای این منظور از ژل متراکم کننده با غلظت ۴ درصد و ژل جداکننده با غلظت ۱۲ درصد وزنی-حجمی پلی‌اکریل‌آمید استفاده شد. الکتروفورز یا ولتاژ ۵۰ ولت در بخش ژل متراکم کننده و ۱۱۰ ولت در ژل جداکننده انجام شد. در انتها ژل با آب مقطر شسته شده و با محلول کوماسی برلیانت بلو رنگ‌آمیزی شد. جهت رنگ‌بری ژل‌ها نیز از (محلول اسید استیک، متانول و آب مقطر) استفاده شد. مارکر پروتئینی مورد استفاده، ExcelBand™ All Blue Regular Range Protein Marker (PM1500) از شرکت SMOBio تایوان با محدوده وزنی تقریبی ۱۰ تا ۱۸۰ کیلو دالتون، شامل ۱۰ باند رنگی، در بافر حاوی تریس-فسفات (۲۰ mM, pH = ۷/۵) ، SDS (۲ درصد)، دی‌تیوتریتول (۰/۲ mM)، اوره (۳/۶ M) و گلیسرول (۱۵ درصد) تهیه و به صورت آماده مصرف در حجم ۵ میکرولیتر برای هر چاهک بارگذاری شد (۱۸).

طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR)

طیف‌های FTIR مربوط به PPI، SFPG و کونژوگه‌های تولید شده در نسبت‌های مختلف با استفاده از طیف‌سنج FTIR (Perkin Elmer, RX1, USA) بدست آمد. برای تهیه نمونه‌ها، مواد مورد نظر با برمید پتاسیم به نسبت جرمی ۱ به ۱۰۰ (وزنی/وزنی) مخلوط شده و در هاون به‌طور یکنواخت آسیاب شدند. طیف‌ها در محدوده طیفی (cm^{-1}) ۴۰۰ تا (cm^{-1}) ۴۰۰۰ با قدرت تفکیک (cm^{-1}) ۲ در دستگاه FTIR مورد آنالیز قرار خواهد گرفت. طیف‌های به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار Origin مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند (۱۹).

رنگ‌سنجی

ارزیابی شاخص‌های رنگی مربوط به نمونه‌ها PPI و کونژوگه‌های تولید شده در نسبت‌های مختلف با استفاده از دستگاه هانتر لب (Color Flex-EZ Tomato, USA) انجام گرفت تا مقادیر a^* ، L^* و b^* اندازه‌گیری گردد. برای این منظور نمونه‌ها در پلیت‌های پلاستیکی با قطر ۵ سانتی‌متر قرار داده شد و شاخص‌های رنگی توسط دستگاه اندازه‌گیری شد (۲۰).

اندازه‌گیری ویژگی‌های امولسیون‌کنندگی

فعالیت امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون به روش کدورت سنجی انجام شد. برای این منظور ۸ میلی‌لیتر از محلول ۱ درصد وزنی-حجمی PPI و کونژوگه‌های تولید شده PPI-SFPG در نسبت‌های مختلف با ۲ میلی‌لیتر روغن آفتابگردان مخلوط شد و پس از آن با استفاده از همگن‌ساز اولتراسونیک با سرعت ۱۲۰۰۰ rpm به مدت دو دقیقه در دمای اتاق همگن گردید. پس از آن ۵۰ میکرولیتر از امولسیون تهیه شده در فواصل زمانی ۰ و ۱۰ دقیقه برداشته شد، ۵ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ درصد وزنی-حجمی سدیم دودسیل سولفات به آن افزوده شد و جذب آن بلافاصله در طول موج ۵۰۰ نانومتر تعیین شد. فعالیت امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون از روابط زیر محاسبه شد (۲۱).

رابطه ۲

$$\text{EAI (m}^2/\text{g)} = (2 \times 2.303 \times N \times A_0) N/L \phi C 10000$$

رابطه ۳

$$\text{ESI (\%)} = A_{10} / A_0 \times 100$$

در این رابطه A_0 جذب در ۵۰۰ نانومتر، N فاکتور رقیق‌سازی، L طول مسیر، Φ کسر حجمی روغن در امولسیون، C غلظت پروتئین در محلول مورد استفاده برای تهیه امولسیون و A_{10} میزان جذب پس از گذشت ۱۰ دقیقه می‌باشد.

سنجش اندازه قطرات و پتانسیل زتا امولسیون

توزیع اندازه قطرات روغن در امولسیون توسط دستگاه تفرق نور پویا Nanotracer Wave II (DLS) (Microtrac, Germany) و نیز پتانسیل زتا توسط دستگاه WALLIS (Cordouan Technology, France) در امولسیون‌های تازه تهیه با افزودن PPI، SFPG و نیز کونژوگه‌های تولید شده در نسبت‌های مختلف، با غلظت ۰/۱ درصد وزنی-حجمی پس از رقیق‌سازی نمونه‌ها به نسبت ۱ به ۱۰۰ با استفاده از آب مقطر، در دمای محیط در ۳ تکرار اندازه‌گیری شد (۲۲).

ویژگی‌های کف‌کنندگی

فعالیت کف‌کنندگی (FA) و پایداری کف (FS) محلول‌های آبی PPI و کونژوگه‌های PPI-SFPG تولید شده در نسبت‌های مختلف مطابق روش چن و همکاران (۲۰۱۷) با برخی اصلاحات اندازه‌گیری شد. محلول‌های آبی با غلظت ۱ درصد وزنی-حجمی در آب دیونیزه تهیه شده و به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای بهبود آبدارگری نگهداری شد. فرایند همگن‌سازی با استفاده از هموژنایزر دور بالا (Ultra-Turrax, T25, IKA-Labortechnik, Staufen, Germany) با سرعت ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲ دقیقه انجام شد. نمونه‌های هواده‌ی شده بلافاصله در استوانه مدرج ریخته شدند و حجم کل بلافاصله و پس از ۳۰ دقیقه قرائت شد (۲۳).

ویژگی‌های کف‌کنندگی بر اساس روابط زیر محاسبه شدند:

رابطه ۴

$$FA (\%) = V_1/V_T \times 100$$

رابطه ۵

$$FS (\%) = V_2/V_1 \times 100$$

در این رابطه V_1 ، V_2 و V_T به ترتیب حجم اولیه کف (بلافاصله پس از هموژن کردن)، حجم کف باقی‌مانده پس از ۳۰ دقیقه، حجم کل دیسپرسیون پس از هموژن کردن در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد.

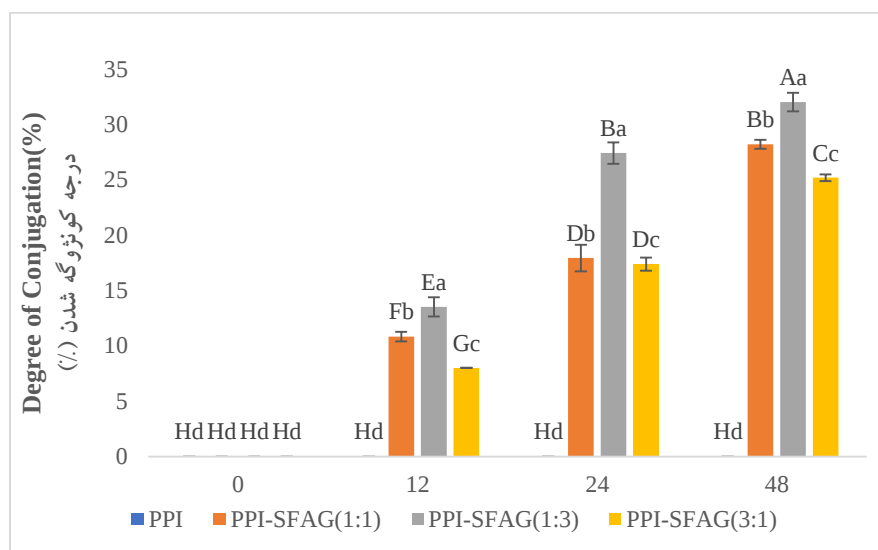
نتایج و بحث

شواهد شکل‌گیری کونژوگه‌های ایزوله پروتئین دانه کدو-بخش محلول صمغ فارسی

درجه کونژوگه‌شدن

درجه کونژوگه‌شدن یک شاخص قابل اطمینان به منظور ارزیابی میزان پیشرفت فرایند تشکیل کونژوگه بین پروتئین و کربوهیدرات طی واکنش میلارد می‌باشد (۲۴). تغییرات درجه کونژوگه‌شدن در نتیجه پیشرفت واکنش طی ۲ روز گرم‌خانه‌گذاری نمونه‌ها در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۷۵ درصد در شکل ۱ نشان داده شده است. همانطور که در نمودار مشخص است، درجه کونژوگه‌شدن برای نمونه‌ها با نسبت‌های پروتئین به کربوهیدرات (۱ به ۱، ۱ به ۳ و ۳ به ۱) با گذشت زمان تا روز دوم به میزان معنی‌داری افزایش یافت ($p \leq 0.05$). این امر نشان‌دهنده کاهش تعداد گروه‌های آمینو در دسترس در نتیجه پیشرفت واکنش و تشکیل کونژوگه بین گروه‌های آمینو ایزوله پروتئین دانه کدو و گروه‌های کربوکسیلیک بخش محلول صمغ فارسی می‌باشد (۲۵). بالاترین میزان درجه کونژوگه‌شدن به میزان $0.81 \pm 0.32/0.2$ درصد، برای نسبت (۱ به ۳) PPI-SFPG مشاهده شد. این امر نشان‌دهنده این است که میزان واکنش‌پذیری گروه‌های آمینواسید ایزوله پروتئین دانه کدو تابعی از نسبت بخش محلول صمغ فارسی می‌باشد. در نتیجه به دلیل گروه‌های واکنش‌پذیر کمتر پلی‌ساکارید در مقایسه با پروتئین، هر پروتئین می‌تواند با چندین پلی‌ساکارید تشکیل پیوند دهد (۲۶). قانیدی و حسینی (۲۰۲۱) گزارش کردند با افزایش نسبت صمغ فارسی به ایزوله پروتئین سویا، درجه کونژوگه‌شدن افزایش می‌یابد. در این پژوهش بالاترین درجه تشکیل کونژوگه برای نسبت‌های (۱ به ۳) ایزوله پروتئین سویا-صمغ فارسی به میزان $0.25 \pm 0.25/0.17$ درصد گزارش شد (۱۳). خوراوندی و همکاران (۲۰۲۴) گزارش کردند با افزایش زمان حرارت‌دهی و نسبت صمغ دانه ریحان به ایزوله پروتئین آب‌پنیر، درجه کونژوگه‌شدن افزایش یافت. بالاترین میزان درجه

کونژوگه شدن ($2/97 \pm 2/89$ درصد) برای نسبت (۲ به ۱) ایزوله پروتئین آب پنیر-صمغ دانه ریحان گزارش شد. حسینی و همکاران (۲۰۲۳) نیز گزارش کردند با افزایش زمان گرم خانه گذاری درجه کونژوگه شدن سدیم کازئینات-بخش محلول صمغ فارسی برای نسبت (۲ به ۱) تا حدود ۶۲ درصد افزایش یافت (۲۷). نتایج حاصل از ارزیابی ها تغییری در درجه کونژوگه شدن پروتئین بعد از گرم خانه گذاری نشان نداد، که این امر احتمالا به دلیل پایداری پروتئین در برابر حرارت می باشد (۲۸).



شکل ۱- درجه کونژوگه شدن کونژوگه های PPI-SFPG (ایزوله پروتئین دانه کدو-بخش محلول صمغ فارسی) و PPI (ایزوله پروتئین دانه کدو) در نسبت های (۱ به ۱، ۱ به ۳ و ۳ به ۱).

حروف معنی داری کوچک مربوط به مقایسه بین تیمارها در یک زمان مشخص و حروف بزرگ مربوط به مقایسه اثر یک

تیمار طی ۴۸ ساعت می باشد ($p \leq 0.05$).

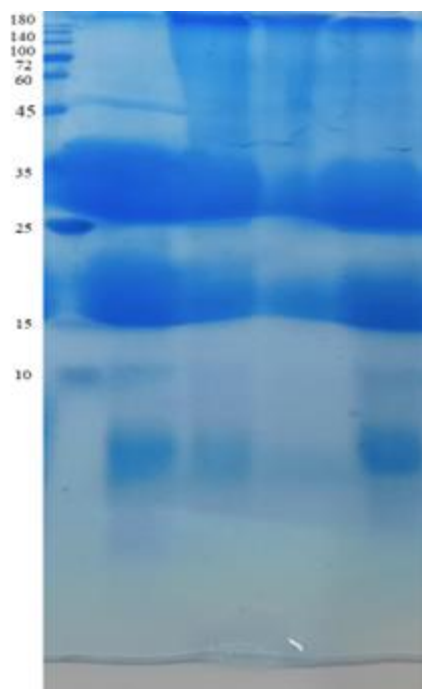
Figure 1 – Degree of conjugation of PPI (Pumpkin seed protein isolate) and PPI-SFPG (Pumpkin seed protein isolate - soluble fraction of Persian gum) conjugates at ratios of (1:1, 1:3 and 3:1). Lowercase letters indicate significant differences among treatments on a specific day, while uppercase letters indicate significant differences in the effect of a treatment over 48 hours ($p \leq 0.05$).

الکتروفورز SDS-PAGE

به منظور تایید و بررسی شکل گیری کونژوگه بین ایزوله پروتئین دانه کدو و بخش محلول صمغ فارسی الکتروفورز SDS-PAGE انجام شد. شکل گیری ترکیبات با وزن مولکولی بالا بیانگر کونژوگه شدن طی واکنش میلارد می باشد. این ترکیبات معمولاً در ژل SDS-PAGE با سرعت آهسته تری حرکت می کنند. در نتیجه در بخش بالای ژل لکه هایی با تراکم بالاتر پروتئین مشاهده می شود (۲۹) در شکل ۲، خط M مارکر خط ۱ پروتئین دانه کدو، خط ۲، ۳، ۴ به ترتیب کونژوگه های PPI-SFPG در نسبت های (۱ به ۱)، (۱ به ۳)، و (۳ به ۱) را مشخص می نماید. همانطور که در شکل مشخص است دامنه وزن مولکولی ایزوله پروتئین دانه کدو عمدتاً در محدوده ۳۵ کیلو دالتون و پایین تر توزیع شده است و مقادیر ناچیزی از پروتئین در وزن های مولکولی بالاتر قرار گرفته است. برای کونژوگه های PPI-SFPG در تمامی نسبت ها تجمع پروتئین ها در محل ورود به ژل تفکیک کننده و نیز پخش شدگی

پروتئین های رنگ گرفته در زمینه ژل در ناحیه وزن مولکولی بالاتر از ۳۵ کیلودالتون قابل تشخیص است. این امر، نشان دهنده شکل گیری ترکیبات با وزن مولکولی بالاتر است که یا قادر نیستند به ژل تفکیک کننده وارد شوند و یا به کندی و با تفکیک ناقص در ژل حرکت می کنند. ترکیبات مذکور احتمالاً به دلیل اتصال بخش محلول صمغ فارسی با وزن مولکولی بالا (۱۳۴ کیلو دالتون) به ایزوله پروتئین دانه کدو (۳۰، ۳۱) و یا پلیمریزاسیون پروتئین تشکیل شده اند (۳۱). حوسین و همکاران (۲۰۲۴) گزارش کردند در نتیجه کونژوگه شدن ایزوله پروتئین سویا-صمغ هلو طی واکنش میلارد، تراکم باندهای مشاهده شده مربوط به ایزوله پروتئین سویا در ژل SDS-PAGE کاهش یافت که این امر بیانگر مشارکت زیرواحدهای پروتئینی در واکنش میلارد و قرارگیری در بخش بالای ژل می باشند (۳۲). صداقت دوست و همکاران (۲۰۲۰) نیز گزارش کردند در نتیجه شکل گیری اتصال کووالانسی بین ایزوله پروتئین آب پنیر-موسیلاژ دانه کتان، به واسطه تولید کونژوگه هایی با وزن مولکولی بالاتر، این ترکیبات قادر به عبور از ژل SDS-PAGE نبوده و در نتیجه باند مربوط α -لاکتالبومین در ژل مشاهده نشد و تنها باند ضعیفی از β -لاکتوگلوبولین در ژل قابل مشاهده بود (۳۳).

kDa M 1 2 3 4



شکل ۲- ارزیابی الکتروفورز SDS-PAGE، PPI (ایزوله پروتئین دانه کدو) (۱) و کوئژوگه‌های PPI-SFPG (ایزوله پروتئین دانه کدو-بخش محلول صمغ فارسی) در نسبت‌های (۲) ۱:۱، (۳) ۱:۳، (۴) ۳:۱ و (M) مارکر.

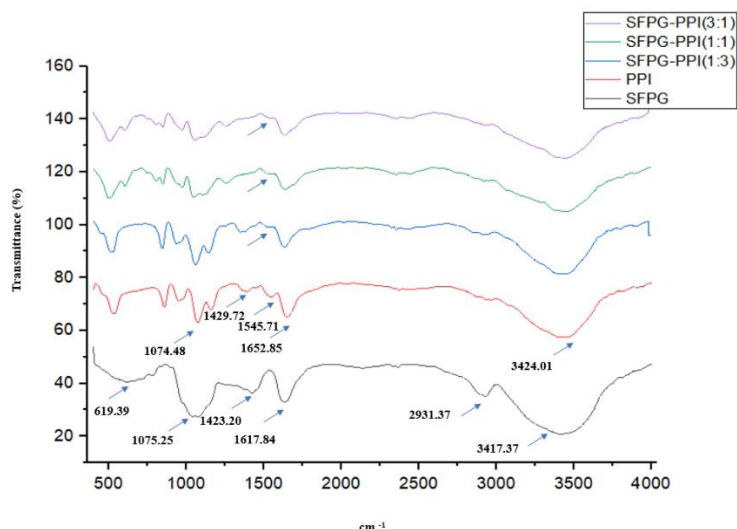
Figure 2 – SDS-PAGE analysis of PPI (Pumpkin seed protein isolate) (1) and PPI–SFPG (Pumpkin seed protein isolate - soluble fraction of Persian gum) conjugates at ratios of 1:1 (2), 1:3 (3), 3:1 (4), and marker (M).

طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه

طیف‌سنجی مادون قرمز با تبدیل فوریه (FTIR) یکی از ابزارهای تحلیلی قدرتمند در شناسایی و ارزیابی برهم‌کنش‌های میان پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌ها به‌شمار می‌رود. این روش به‌ویژه برای بررسی تشکیل پیوندهای کووالانسی بین گروه‌های آمین (NH_2) موجود در بقایای آمینواسیدی پروتئین و گروه‌های کربونیل کربوهیدرات‌ها در طی فرآیند تشکیل کونژوگه کاربرد گسترده‌ای دارد (۳۴).

اگرچه طیف FTIR ایزوله پروتئین دانه کدو و بخش محلول صمغ فارسی طیف‌های معمول را برای پروتئین و کربوهیدرات نشان می‌دهد، افزودن صمغ به پروتئین و به دنبال آن واکنش میلارد منجر به تغییراتی در طیف FTIR کونژوگه‌های حاصل می‌گردد. شکل ۳ تغییرات ساختاری ایزوله پروتئین دانه کدو و بخش محلول صمغ فارسی را پس از فرایند تشکیل کونژوگه طی واکنش میلارد نشان می‌دهد. محل‌های پیک‌های شاخص ایزوله پروتئین دانه کدو در عدد موجی $3424/01 \text{ cm}^{-1}$ (باند آمید A: ارتعاشات کششی پیوندهای N-H و ارتعاشات جذبی پیوند هیدروژنی)، $1652/85 \text{ cm}^{-1}$ (پیوند آمید نوع اول: ارتعاشات کششی C=O) و $1545/71 \text{ cm}^{-1}$ (پیوند آمید نوع دوم: ارتعاشات کششی C-N همراه با ارتعاشات خمشی N-H) مشاهده شد (۳۵). بخش محلول صمغ فارسی دو پیک شاخص در عدد موجی $3417/37 \text{ cm}^{-1}$ و $2928/37 \text{ cm}^{-1}$ را نشان داد که به ترتیب مربوط به حالت‌های کششی OH و CH— از گروه‌های هیدروکسیل و گروه‌های CH $\square$ می‌باشد (۳۶). پیک در عدد موجی $1617/84 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به بخش پروتئینی صمغ است (۳۷). در حالی که پیک‌های ظاهر شده در عدد موجی $1423/20 \text{ cm}^{-1}$ و $1075/25 \text{ cm}^{-1}$ به ترتیب به کشش متقارن گروه‌های کربوکسیلیک و ارتعاش پیوند گلیکوزیدی نسبت داده شده است (۳۸). پیک در ناحیه $619/39 \text{ cm}^{-1}$ ممکن است با واحدهای گالاکتوپیرانوز در زنجیره اصلی ساختار صمغ، مرتبط باشد (۳۶). نتایج ارائه شده مشابه با پیک‌های گزارش شده توسط هاشمی و حسینی (۲۰۲۱) برای جزء محلول صمغ فارسی می‌باشد (۳۹). همانطور که انتظار می‌رفت، وقوع واکنش شیمیایی بین ایزوله پروتئین دانه کدو و بخش محلول صمغ فارسی طی واکنش‌های میلارد باعث تغییراتی در طیف‌های FTIR کونژوگه‌ها می‌گردد. پیک شاخص مربوط به ارتعاشات کششی C=O (1652 cm^{-1}) در ناحیه آمید نوع اول بدون تغییر باقی ماند (۴۰). درحالی که پیک موجود در عدد موجی 1545 cm^{-1} مربوط به ناحیه آمید نوع دوم برای تمامی کونژوگه‌ها مشاهده نشد که این امر وقوع اتصالات کووالانسی بین ایزوله پروتئین دانه کدو و بخش محلول صمغ فارسی را تایید می‌کند (۴۱). به طور کلی فرایند کونژوگه‌شدن بین پروتئین و صمغ در نتیجه شکل‌گیری محصولات واکنش میلارد، با کاهش پیوندهای مرتبط با گروه NH_2 همراه است. ما و همکاران ۲۰۱۹ در ارتباط با کونژوگه‌های پکتین-ایزوله پروتئین سویا گزارش کردند، در نتیجه تشکیل کونژوگه پیوندهای جذبی در عدد موجی 1538 cm^{-1} به میزان چشمگیری در مقایسه با ایزوله پروتئین سویا کاهش می‌یابد (۴۲). رحمانی و همکاران (۲۰۲۱) نیز گزارش کردند در نتیجه شکل‌گیری پیوند کووالانسی بین کونژوگه‌های پروتئین کازئینات-بخش محلول صمغ فارسی پیک مرتبط با ناحیه آمید نوع دوم ناپدید شد که با نتایج بدست آمده در این پژوهش مطابقت داشت (۴۳). علاوه بر این، پیک‌های مرتبط با ناحیه آمید نوع سوم (عدد موجی $1450-1240 \text{ cm}^{-1}$) در کونژوگه (۳-بِه) PPI-SFPG قابل تشخیص نیست که این امر نشان‌دهنده درجه بیشتر تشکیل کونژوگه در مقایسه با سایر نسبت‌ها می‌باشد که با نتایج درجه کونژوگه‌شدن بالاتر نسبت به سایر کونژوگه‌ها که در جدول ۱ ارائه‌شده همخوانی دارد (۴۴). این نتایج مشابه با نتایج ارائه شده در

مطالعات پیشین برای کونژوگه‌های بخش محلول صمغ فارسی- سدیم کازئینات (۴۳) و کونژوگه‌های بخش محلول صمغ فارسی- ژلاتین ماهی (۱۵) بود.



شکل ۳- طیف‌های FTIR کونژوگه‌های PPI-SFPG (ایزوله پروتئین دانه کدو-بخش محلول صمغ فارسی) و PPI (ایزوله پروتئین دانه کدو) در نسبت‌های (۱ به ۱، ۳ به ۱ و ۳ به ۳).

Figure 3 – FTIR spectra of PPI (Pumpkin seed protein isolate) and PPI–SFPG (Pumpkin seed protein isolate - soluble fraction of Persian gum) conjugates at ratios of (1:1, 1:3 and 3:1).

رنگ‌سنجی

رنگ کونژوگه‌های پروتئین-پلی ساکارید می‌تواند به‌عنوان یک شاخص تحلیلی برای تعیین میزان پیشرفت فرایند کونژوگه شدن بین پروتئین و قند احیا مورد استفاده قرار گیرد (۲۸). همان‌طور که در جدول ۱ نشان داده شده است، میزان روشنایی (L^*) کونژوگه‌ها نسبت به ایزوله پروتئین دانه کدو کاهش یافت که بیشترین کاهش مربوط به کونژوگه PPI-SFPG با نسبت (۳ به ۱) بود ($p \leq 0.05$). این امر نشان‌دهنده تشکیل پیوند کووالانسی طی واکنش میلارد است (۴۵).

بیشترین میزان قرمزی (a^*) و زردی نیز (b^*) برای کونژوگه PPI-SFPG با نسبت (۳ به ۱) مشاهده شد. بوستار و حسینی (۲۰۲۱) نیز گزارش کردند با افزایش نسبت صمغ فارسی در کونژوگه‌ها میزان L^* کاهش و میزان a^* و b^* افزایش یافت (۱۵). پنگ و همکاران (۲۰۲۵) گزارش کردند در نتیجه وقوع واکنش میلارد و تشکیل کونژوگه‌های ایزوله پروتئین کینوا با انواع قندها، میزان L^* کاهش و میزان a^* و b^* افزایش یافت (۴۶). نتایج مشابهی برای پروتئین جیرجیرک (*Acheta domesticus*) کونژوگه‌شده با پلی ساکارید نیز گزارش شده است (۲۰).

جدول ۱- ویژگی‌های رنگی PPI (ایزوله پروتئین دانه کدو) و PPI-SFPG (ایزوله پروتئین دانه کدو-بخش محلول صمغ فارسی) در نسبت‌های (۱ به ۱، ۳ به ۱ و ۳ به ۳).

Table 1 – Color characteristics of PPI (Pumpkin seed protein isolate) and PPI–SFPG (Pumpkin seed protein isolate - soluble fraction of Persian gum) conjugates at ratios of (1:1, 1:3 and 3:1).

Samples نمونه ها	L* روشنایی	a* قرمزی	b* زردی
PPI	85.2±0.1 ^a	-4.5±0.3 ^d	13.7±0.4 ^d
PPI-SFPG(1:1)	69.4±0.3 ^b	3.7±0.1 ^b	25.2±0.5 ^b
PPI-SFPG(1:3)	66.8±0.5 ^c	4.3±0.2 ^a	27.5±0.3 ^a
PPI-SFAG(3:1)	73.8±0.5 ^d	-0.04±0.1 ^c	24.5±0.6 ^c

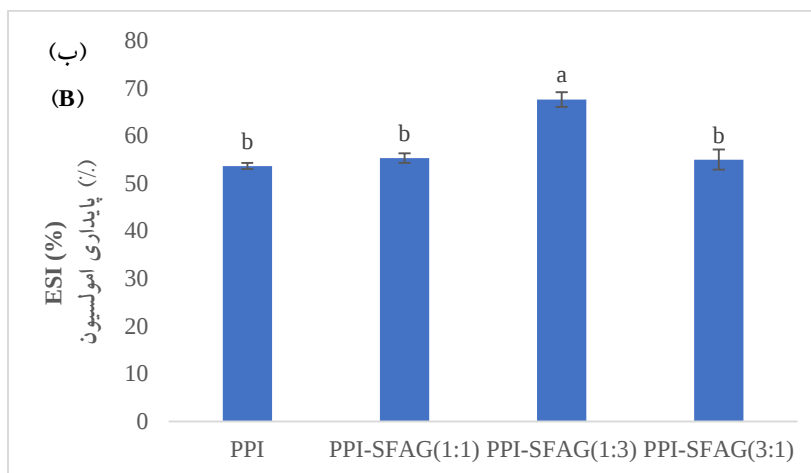
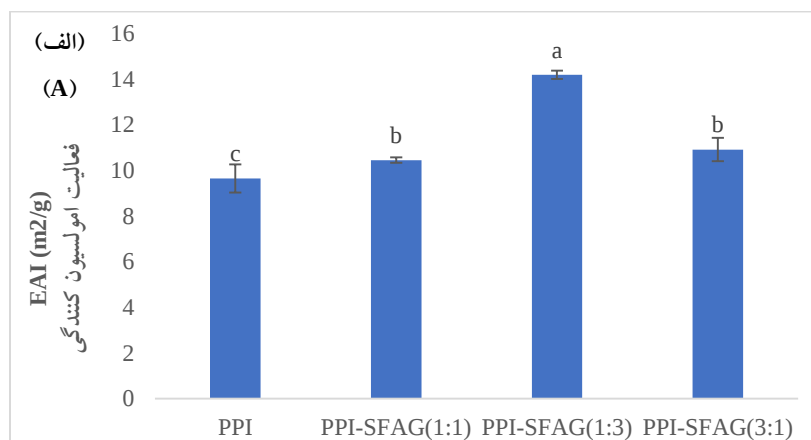
*حروف متفاوت در هر ستون اختلاف معنادار بین نمونه ها در سطح ۵ درصد را نشان میدهد ($p \leq 0.05$).

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

ارزیابی خصوصیات امولسیون کنندگی

به منظور ارزیابی خصوصیات امولسیون کنندگی کونژوگه های ایزوله پروتئین دانه کدو-بخش محلول صمغ فارسی، آزمون کدورت سنجی در طول موج ۵۰۰ نانومتر انجام شد. کدورت در زمان صفر پس از تشکیل امولسیون، نشان دهنده فعالیت امولسیون کنندگی و پس از ۱۰ دقیقه نشانگر پایداری امولسیون می باشد. شکل ۴ شاخص فعالیت امولسیون کنندگی و پایداری آن را برای PPI و PPI-SFPG در نسبت های مختلف را نشان می دهد. شاخص فعالیت امولسیون کنندگی و پایداری امولسیون برای همه کژوگه ها در مقایسه با ایزوله پروتئین دانه کدو بالاتر بود. به طور کلی در منابع مختلف گزارش شده است، پروتئین در نتیجه تشکیل کونژوگه طی واکنش میلارد، خصوصیات امولسیون کنندگی بهتری را در مقایسه با شکل اولیه خود به نمایش می گذارد (۱۵). مطالعات پیشین نشان داده اند که تشکیل کونژوگه پروتئین- پلی ساکارید، ویژگی های برجسته پروتئین و پلی ساکارید را با هم به نمایش می گذارد. از این رو در سیستم های امولسیونی، مولکول پروتئین می تواند به سرعت در سطح مشترک آب/روغن جذب شده و یک فیلم آمفی پاتیک را ایجاد کند. در مقابل پلی ساکاریدهای بلند زنجیر با حلالیت عالی، در محیط های آبی از طریق افزایش ویسکوزیته فیلم اطراف قطرات روغن، نقش حفاظتی در محیط ایفا می کنند. این نوع از همکاری مانع از فلوکوله شدن و ادغام مولکول های پروتئین و در نتیجه ارتقا خصوصیات امولسیون کنندگی می گردد (۴۷). بنابراین با توجه به نتایج واضح است تشکیل کونژوگه بین ایزوله پروتئین دانه کدو و بخش محلول صمغ فارسی با تغییر ساختار پروتئین قادر است فعالیت امولسیون کنندگی را بهبود بخشد. بالاترین میزان فعالیت امولسیون کنندگی $0.18 \pm 0.14 \text{ m}^2/\text{g}$ برای کونژوگه PPI-SFPG (۱ به ۳) مشاهده شد ($p \leq 0.05$). به طور کلی فعالیت امولسیون کنندگی کونژوگه ها با افزایش نسبت بخش محلول صمغ فارسی به پروتئین، افزایش پیدا کرده است که این امر می تواند با افزایش سطح HLB یا تعادل بخش آبدوست و آبگریز مرتبط باشد. خوراوندی و همکاران (۲۰۲۳) گزارش کردند افزایش نسبت وزنی صمغ دانه ریحان به ایزوله پروتئین آب پنیتر تاثیر معناداری ($p \leq 0.05$) بر شاخص فعالیت امولسیون کنندگی و پایداری امولسیونی دارد. بیشترین فعالیت امولسیون کنندگی به میزان $2.71 \pm 0.29 \text{ m}^2/\text{g}$ برای نسبت (۲ به ۱) ایزوله پروتئین آب پنیتر-صمغ دانه ریحان مشاهده شد (۲۷). Ye و همکاران (۲۰۲۵) گزارش کردند تغییر ساختار پروتئین طی فرایند تشکیل کونژوگه، منجر به در معرض قرار گرفتن بیشتر گروه های آبگریز در سطح پروتئین می گردد. در نتیجه با تغییر در تعادل بخش آبدوست و آبگریز پروتئین، کشش سطحی کاهش یافته و شاخص های امولسیون کنندگی بهبود می یابد (۴۸).

شاخص پایداری امولسیون ($0.71 \pm 0.67/56$ درصد) نیز برای کونژوگه کونژوگه PPI-SFPG (به ۳) به گونه معنی داری از پروتئین و سایر نسبت‌ها بالاتر بود ($p \leq 0.05$). این امر اساساً به توانایی بالای کونژوگه در تشکیل لایه‌ای ضخیم، پیوسته و ویسکوالاستیک در سطح مشترک روغن/آب نسبت داده می‌شود (۴۹). حوسین و همکاران (۲۰۲۴) نیز بهبود قابل توجهی در ویژگی‌های امولسیون‌کنندگی کونژوگه‌های ایزوله پروتئین سویا-صمغ هلو در مقایسه با ایزوله پروتئین سویا گزارش کردند. علاوه بر این گزارش شد نسبت وزنی صمغ به پروتئین تأثیر معنی داری بر ویژگی‌های امولسیون‌کنندگی دارد. در این پژوهش بیشترین میزان شاخص فعالیت امولسیون‌کنندگی ($1.75 \pm 0.35 \text{ m}^2/\text{g}$) و پایداری امولسیون (2.7 ± 0.60 درصد) برای ایزوله پروتئین سویا-صمغ هلو با نسبت (به ۳) گزارش شد (۳۲). بوستار و حسینی نیز گزارش کردند شاخص پایداری امولسیون برای امولسیون‌های پایدار شده با کونژوگه ژلاتین ماهی-بخش محلول صمغ فارسی در نسبت (به ۲) از سایر نسبت‌ها و نیز پروتئین به تنهایی، بالاتر بود (۱۵). نتایج حاصل از ارزیابی‌های خصوصیات امولسیون‌کنندگی کونژوگه‌ها در نسبت‌های مختلف با نتایج درجه کونژوگه‌شدن که در شکل ۱ ارائه شده هم راستا بود. نتایج مشابهی توسط چن و همکاران (۲۰۱۹) گزارش شده است. آن‌ها گزارش کردند که کونژوگه‌های ایزوله پروتئین آب‌پنیر-صمغ اقاقیا در مقایسه با پروتئین خالص، پایداری امولسیون را به‌طور معنی داری افزایش می‌دهند. همچنین، با افزایش درجه کونژوگه‌شدن، پایداری امولسیون بهبود یافت که این امر به کاهش اندازه قطرات روغن و افزایش دافعه الکترواستاتیک میان آن‌ها نسبت داده شده است (۵۰).



شکل ۴- شاخص فعالیت امولسیون‌کنندگی (الف) و پایداری امولسیون (ب) PPI (ایزوله پروتئین دانه کدو) و کونژوگه‌های PPI-SFPG (ایزوله

پروتئین دانه کدو-بخش محلول صمغ فارسی) در نسبت‌های (۱ به ۱، ۳ به ۱ و ۳ به ۳).

حروف متفاوت در هر ستون اختلاف معنادار بین نمونه‌ها در سطح ۵ درصد را نشان می‌دهد ($p \leq 0.05$).

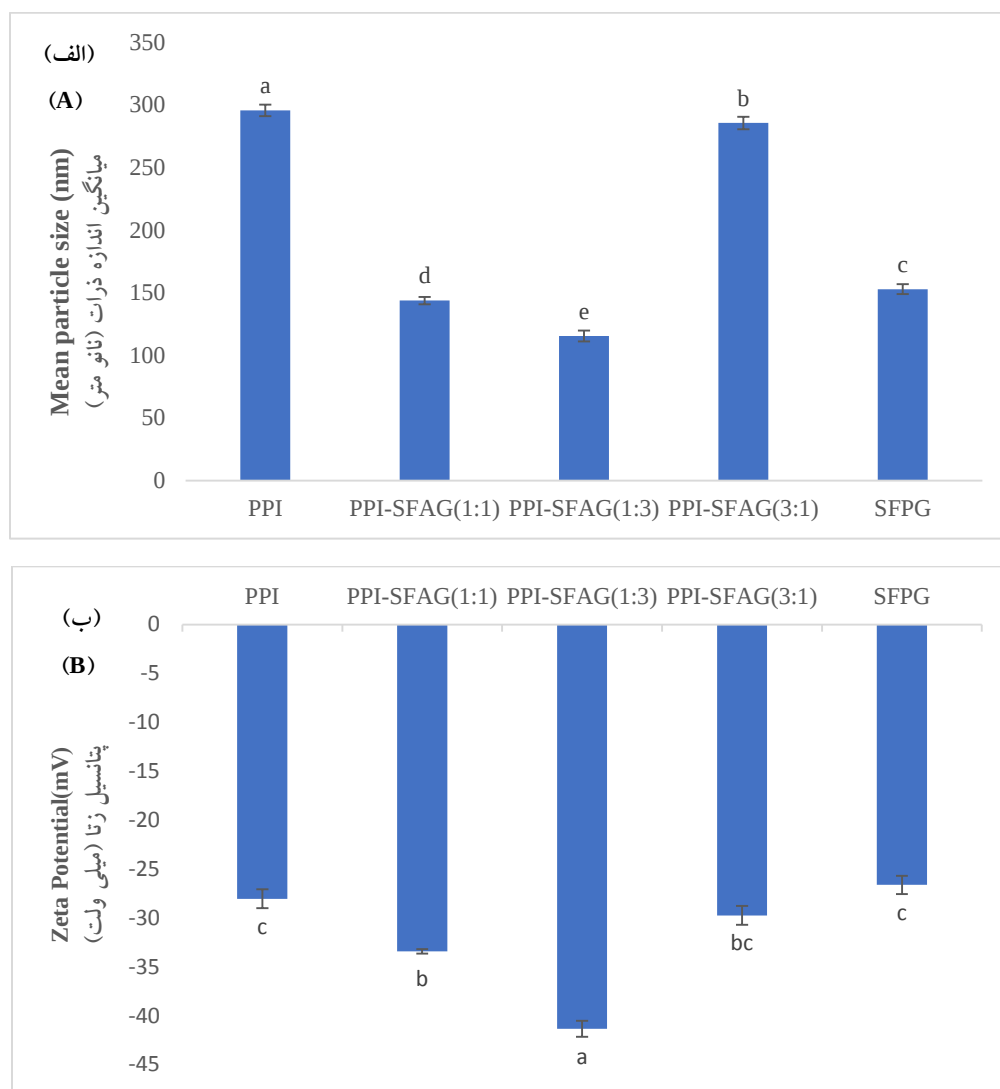
Figure 4 – Emulsifying activity index (A) and emulsion stability index (B) of PPI (Pumpkin seed protein isolate) and PPI-SFPG (Pumpkin seed protein isolate - soluble fraction of Persian gum) conjugates at ratios of (1:1, 1:3, and 3:1). Different letters in each column indicate a significant difference at 5% ($p \leq 0.05$).

اندازه قطرات و پتانسیل زتا امولسیون

پایداری امولسیون‌ها تابعی از اندازه قطرات آن‌هاست، به گونه‌ای که کاهش اندازه قطرات روغن معمولاً به افزایش پایداری امولسیون منجر می‌شود (۵۱). بررسی‌ها نشان داد که قطر متوسط قطرات روغن در امولسیون تازه تهیه‌شده با استفاده از PPI به‌طور معناداری بزرگ‌تر از امولسیون‌های تهیه‌شده با کونژوگه‌های PPI-SFPG در نسبت‌های مختلف بود (شکل ۵-الف) ($p \leq 0.05$). افزایش نسبت بخش محلول صمغ فارسی در کونژوگه‌ها منجر به تشکیل قطرات روغن کوچک‌تر گردید. پدیده‌ای که می‌توان آن را به ویسکوزیته بالاتر ناشی از حضور صمغ نسبت داد که با محدود کردن حرکت آزادانه قطرات روغن، از رشد آن‌ها جلوگیری می‌کند (۵۲). بر این اساس کوچکترین قطر قطرات روغن برای امولسیون‌های حاوی کونژوگه (۳ به ۱) PPI-SFPG تعیین شد ($p \leq 0.05$). قانلی و حسینی (۲۰۲۱) نیز گزارش کردند با افزایش نسبت صمغ فارسی در کونژوگه‌ها، قطر قطرات امولسیون‌های تولیدی کاهش می‌یابد. در همین راستا کوچکترین قطر قطرات روغن برای امولسیون تولید شده با ایزوله پروتئین سویا-صمغ فارسی با نسبت (۳ به ۱) گزارش شد (۱۳).

در شکل ۵ (ب) مقادیر پتانسیل زتا برای PPI و کونژوگه‌های PPI-SFPG در $pH=7$ آورده شده است. میانگین پتانسیل زتا نشان‌دهنده تراکم بار سطحی قطرات روغن در امولسیون است. مقادیر بیشتر پتانسیل زتا نشان‌دهنده شدت دافعه الکترواستاتیک بیشتر بین ذرات می‌باشد که در نتیجه این امر پایداری امولسیون افزایش پیدا می‌کند (۵۳). همانطور که در شکل ۵ مشخص است مقادیر پتانسیل زتا برای PPI، SFPG و کونژوگه‌های PPI-SFPG در $pH=7$ منفی بود. این امر به دلیل بار منفی پروتئین و صمغ در pH مذکور می‌باشد. نقطه ایزوالکتریک ایزوله پروتئین دانه کدو در پژوهش‌های پیشین در محدوده ۵ گزارش شده است. (۵۴). بنابراین با توجه به اینکه بار خالص پروتئین در pH بالاتر از نقطه ایزوالکتریک منفی است، مقدار پتانسیل زتا منفی چندان دور از انتظار نیست. پتانسیل زتا منفی برای بخش محلول صمغ فارسی نیز با توجه به طبیعت آنیونی این پلی‌ساکارید، قابل توضیح است. با توجه به توضیحات فوق، بار سطحی قطرات روغن در امولسیون‌های تولید شده برای نمونه‌های مورد ارزیابی، منفی بود. مقادیر پتانسیل زتا برای قطرات روغن پوشش‌دهی شده با ایزوله پروتئین دانه کدو $-28.05 \pm 0.96 \text{ mV}$ و برای امولسیون حاوی بخش محلول صمغ فارسی در حدود $-26.62 \pm 0.92 \text{ mV}$ اندازه‌گیری شد که با مقادیر گزارش شده در پژوهش‌های پیشین برای پروتئین (۵۴) و صمغ فارسی مطابقت داشت (۲۲). مقادیر پتانسیل زتا برای امولسیون‌های حاوی کونژوگه‌های PPI-SFPG در نسبت‌های مختلف در مقایسه با امولسیون حاوی PPI به عنوان امولسی‌فایر به گونه معنی‌داری بالاتر بود ($p \leq 0.05$). مقادیر پتانسیل زتا برای کونژوگه PPI-SFPG با افزایش میزان صمغ (از ۰/۷۵ تا ۰/۲۵ درصد) افزایش یافت و بالاترین میزان پتانسیل زتا

برای کنژوگه PPI-SFPG در نسبت (۳ به ۱) تعیین شد. قاندى و حسینی (۲۰۲۱) گزارش کردند، قطرات روغن پوشش دهی شده در امولسیون‌های حاوی ایزوله پروتئین سویا، میزان پتانسیل زتا پایین‌تری (-32 mV) در مقایسه با امولسیون‌های حاوی کنژوگه‌های ایزوله پروتئین سویا-صمغ فارسی (بیش از -60 mV) نشان دادند (۱۳). این نتایج با یافته‌های حاصل از این پژوهش حاضر هم‌راستا بود.



شکل ۴- میانگین اندازه ذرات (الف) و پتانسیل زتا (ب) امولسیون‌های تهیه شده با PPI (ایزوله پروتئین دانه کدو) و کنژوگه‌های PPI-SFPG (ایزوله پروتئین دانه کدو-بخش محلول صمغ فارسی) در نسبت‌های (۱:۱، ۱:۳ و ۳:۱).

حروف متفاوت در هر ستون اختلاف معنادار بین نمونه‌ها در سطح ۵ درصد را نشان می‌دهد ($p \leq 0.05$).

Figure 4 – Mean particle size (a) and zeta potential (b) of emulsions prepared with PPI (Pumpkin seed protein isolate) and PPI-SFPG (Pumpkin seed protein isolate - soluble fraction of Persian gum) conjugates at ratios of (1:1, 1:3, and 3:1).

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

ویژگی‌های مهم مربوط به خواص کف‌کنندگی پروتئین و کونژوگه‌های تولیدشده، شامل ظرفیت کف‌کنندگی (FC) و پایداری کف (FS) می‌باشد. ظرفیت کف‌کنندگی بیانگر میزان سطح بین‌فازی است که پروتئین یا کونژوگه قادر به ایجاد آن است و ارتباط تنگاتنگی با آب‌گریزی آن دارد. در مقابل، پایداری کف نشان‌دهنده مقاومت کف تولیدشده در برابر تنش‌های محیطی طی یک بازه زمانی معین می‌باشد (۵۵). تولید کف به فیلم بین‌سطحی ایجادشده و توانایی این فیلم در نگهداری حباب‌های هوا و کاهش سرعت ادغام آن‌ها وابسته است (۵۶). ویژگی‌های کف‌کنندگی تحت تأثیر عواملی مشابه با ویژگی‌های امولسیون قرار دارند (۵۷). شاخص‌های ظرفیت کف‌کنندگی و پایداری کف در جدول ۲ آورده شده است. ظرفیت کف‌کنندگی کونژوگه‌ها در نسبت‌های مختلف در مقایسه با پروتئین به میزان معنی‌داری بالاتر بود ($p \leq 0.05$). بالاترین میزان ظرفیت کف‌کنندگی برای کونژوگه (۳به۱) PPI-SFPG به میزان $1/0.2 \pm 36/23$ درصد تعیین شد. در نتیجه تشکیل کونژوگه، کربوهیدرات‌ها می‌توانند از باز شدن ساختار پروتئین جلوگیری کرده و سبب افزایش تجمع آن در سطح مشترک آب/حباب‌های هوا گردند. این پدیده موجب بهبود پایداری پروتئین و افزایش مقاومت آن در برابر آب‌اندازی می‌شود. این یافته‌ها با نتایج بدست آمده برای شاخص فعالیت امولسیون‌کنندگی هم راستا بود. حسینی و همکاران (۲۰۲۳) گزارش کردند در نتیجه کونژوگه‌شدن برای کونژوگه‌های سدیم کازئینات-بخش محلول صمغ فارسی در نسبت (۲به۱) ظرفیت کف‌کنندگی افزایش می‌یابد (۱۴). بوستار و حسینی نیز گزارش کردند با افزایش نسبت صمغ در کونژوگه‌های ژلاتین-بخش محلول صمغ فارسی، به واسطه افزایش ویسکوزیته محیط، ویژگی‌های کف‌کنندگی ارتقا پیدا می‌کند. بیشترین میزان ظرفیت کف‌کنندگی ($2/72 \pm 24/16$ درصد) برای کونژوگه ژلاتین-بخش محلول صمغ فارسی در نسبت (۲به۱) گزارش شد (۱۵). بالاترین میزان شاخص پایداری کف به میزان $0/32 \pm 27/53$ درصد نیز برای کونژوگه (۳به۱) PPI-SFPG مشاهده شد. این نتایج نشان‌دهنده تأثیر مثبت و معنی‌دار فرایند تشکیل کونژوگه بر پایداری کف می‌باشد. این پدیده را می‌توان به ساختار آمفی‌فیلک کونژوگه‌های تشکیل‌شده نسبت داد که قادر است کشش سطحی را کاهش داده و به پایداری کف کمک کند. حوسین و همکاران (۲۰۲۴) نیز گزارش کردند ویژگی‌های کف‌کنندگی و پایداری کف با افزایش نسبت جرمی صمغ به پروتئین به‌طور معناداری افزایش می‌یابد. در این پژوهش کونژوگه‌ی ایزوله پروتئین سویا-صمغ هلو با نسبت ۳به۱ بیشترین میزان ظرفیت کف‌کنندگی و پایداری کف را به ترتیب در حدود ۴۵ و ۵۰ درصد نشان دادند (۳۲). پیش‌تر نیز گزارش شده است که افزودن زانتان و صمغ عربی به ایزوله پروتئین دانه کدو منجر به بهبود پایداری کف می‌گردد. حضور این صمغ‌ها معمولاً با افزایش ویسکوزیته فاز مایع، تشکیل فیلم‌های منسجم و منعطف در اطراف حباب‌های هوا و نیز کاهش نیروهای برهم‌کنش در محلول همراه بوده که در نهایت به ارتقاء پایداری کف منجر می‌شود (۵۶).

جدول ۲- ویژگی‌های کف‌کنندگی PPI (ایزوله پروتئین دانه کدو) و PPI-SFPG (ایزوله پروتئین دانه کدو-بخش محلول صمغ فارسی) در

نسبت‌های (۱به۱، ۳به۱ و ۳به۳).

Table 2- Foaming properties of PPI (Pumpkin seed protein isolate) and PPI-SFPG (Pumpkin seed protein isolate - soluble fraction of Persian gum) conjugates at ratios of (1:1, 1:3 and 3:1).

نمونه‌ها Samples	ویژگی‌های کف‌کنندگی Foaming properties	
	ظرفیت کف‌کنندگی Foaming capacity (FC)	پایداری کف Foaming stability (FS)
PPI	23.49 ± 0.04^d	16.43 ± 0.2^d

PPI-SFPG(1:1)	35.64±0.3 ^b	25.57±0.3 ^b
PPI-SFPG(1:3)	36.23±0.07 ^a	27.53±0.1 ^a
PPI-SFAG(3:1)	30.41±0.2 ^c	23.52±0.2 ^c

*حروف متفاوت در هر ستون اختلاف معنادار بین نمونه ها در سطح ۵ درصد را نشان میدهد ($p \leq 0.05$).

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

نتیجه گیری

در پژوهش حاضر امکان شکل گیری کونژوگه های ایزوله پروتئین دانه کدو-بخش محلول صمغ فارسی طی واکنش میلارد به روش خشک در شرایط کنترل شده (دمای ۶۰ درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی ۷۵ درصد) در نسبت های مختلف مورد مطالعه قرار گرفت. ارزیابی های شاخص های رنگی، طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR) و نیز پروفایل الکتروفورز، شکل گیری واکنش میلارد و تشکیل کونژوگه های ایزوله پروتئین دانه کدو-بخش محلول صمغ فارسی را تایید کرد. بالاترین درصد تشکیل کونژوگه برای نسبت (۳به۱) ایزوله پروتئین دانه کدو-بخش محلول صمغ فارسی در آزمون OPA تعیین شد. نتایج نشان داد کونژوگه های تولید شده در مقایسه با پروتئین به تنهایی ویژگی های عملکردی بهتری را به نمایش می گذارند. هم راستا با نتایج آزمون OPA، نسبت اختلاط بهینه برای دستیابی به بهترین ویژگی های عملکردی، نسبت (۳به۱) ایزوله پروتئین دانه کدو-بخش محلول صمغ فارسی تعیین شد. به طور کلی نتایج نشان داد فرایند کونژوگه شدن منجر به تولید ساختارهای با ویژگی های عملکردی بهبود یافته می شود که می توان از آن به عنوان بخشی از فرمولاسیون در طیف گسترده ای از فراورده های غذایی از جمله نوشیدنی ها، محصولات نانوائی و فراورده های لبنی استفاده نمود.

منابع:

1. Paximada, P., Howarth, M., & Dubey, B. N. (2021). Double emulsions fortified with plant and milk proteins as fat replacers in cheese. *Journal of Food Engineering*, 288, 110229.
2. Vaštag, Ž., Popović, L., Popović, S., Krimer, V., & Peričin, D. (2011). Production of enzymatic hydrolysates with antioxidant and angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity from pumpkin oil cake protein isolate. *Food Chemistry*, 124(4), 1316-1321.
3. Xia, B., Liu, Y., Dong, C., Shen, Y., & Wang, C. (2024). Enhancing the usability of pea protein in emulsion applications through modification by various approaches: A comparative study. *Food Research International*, 188, 114477.
4. Wang, Y., Wang, J. L., Li, K. E., Yuan, J. J., Chen, B., Wang, Y. T., ... & Bai, Y. H. (2025). Effect of chickpea protein modified with combined heating and high-pressure homogenization on enhancing the gelation of reduced phosphate myofibrillar protein. *Food Chemistry*, 463, 141180.
5. Li, Q., Shen, F., He, X., Xing, C., Yan, W., Fang, Y., & Hu, Q. (2023). Modification of soy protein isolate using dielectric barrier discharge cold plasma assisted by modified atmosphere packaging. *Food Chemistry*, 401, 134158.
6. Ke, Q., Ma, K., Zhang, Y., Meng, Q., Huang, X., & Kou, X. (2023). Antibacterial aroma compounds as property modifiers for electrospun biopolymer nanofibers of proteins and polysaccharides: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 253, 126563.
7. Li, C., Huang, X., Peng, Q., Shan, Y., & Xue, F. (2014). Physicochemical properties of peanut protein isolate-glucomannan conjugates prepared by ultrasonic treatment. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(5), 1722-1727.

8. Liu, X., Ji, Y., Wang, H., Zhang, Y., & Zhang, H. (2023). Effect of glycosylated potato protein on the characteristics of gluten-free dough and steamed bread. *International Journal of Food Science and Technology*, 58(11), 5657-5668.
9. Zhang, Q., Li, L., Lan, Q., Li, M., Wu, D., Chen, H., ... & Yang, W. (2019). Protein glycosylation: A promising way to modify the functional properties and extend the application in food system. *Critical reviews in food science and nutrition*, 59(15), 2506-2533.
10. Abbasi, S., & Mohammadi, S. (2013). Stabilization of milk–orange juice mixture using Persian gum: Efficiency and mechanism. *Food Bioscience*, 2, 53-60.
11. Kadkhodaei, R., & Mahfouzi, M. (2022). Chemistry and food applications of Persian gum. In *Gums, resins and latexes of plant origin: chemistry, biological activities and uses* (pp. 307-331). Cham: Springer International Publishing.
12. Dabestani, M., Kadkhodaei, R., Phillips, G. O., & Abbasi, S. (2018). Persian gum: A comprehensive review on its physicochemical and functional properties. *Food Hydrocolloids*, 78, 92-99.
13. Ghaedi, N., & Hosseini, E. (2021). Physical and oxidative stability of emulsions treated with bitter almond gum–soy protein isolate Maillard conjugates. *Lwt*, 152, 112352.
14. Hosseini, E., Alinejad, H., & Rousta, E. (2023). Functional characterizations of sodium caseinate conjugated with water-soluble bitter almond gum exudate. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 5, 100292.
15. Bostar, M., & Hosseini, E. (2021). Improving the functional properties of fish gelatin by conjugation with the water-soluble fraction of bitter almond gum. *Food Science and Biotechnology*, 30(1), 55-63.
16. Bučko, S., Katona, J., Popović, L., Vaštag, Ž., Petrović, L., & Vučinić–Vasić, M. (2015). Investigation on solubility, interfacial and emulsifying properties of pumpkin (*Cucurbita pepo*) seed protein isolate. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2), 609-615.
17. Wong, B. T., Day, L., McNaughton, D., & Augustin, M. A. (2009). The effect of maillard conjugation of deamidated wheat proteins with low molecular weight carbohydrates on the secondary structure of the protein. *Food Biophysics*, 4(1), 1-12.
18. Laemmli, U. K. (1975). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, 256, 495-497.
19. Yang, C., Wang, B., Wang, J., Xia, S., & Wu, Y. (2019). Effect of pyrogalllic acid (1, 2, 3-benzenetriol) polyphenol-protein covalent conjugation reaction degree on structure and antioxidant properties of pumpkin (*Cucurbita* sp.) seed protein isolate. *Lwt*, 109, 443-449.
20. Chailangka, A., Seesuriyachan, P., Wangtueai, S., Ruksiriwanich, W., Jantanasakulwong, K., Rachtanapun, P., & Phimolsiripol, Y. (2022). Cricket protein conjugated with different degrees of polymerization saccharides by Maillard reaction as a novel functional ingredient. *Food Chemistry*, 395, 133594.
21. Ma, X., Chen, W., Yan, T., Wang, D., Hou, F., Miao, S., & Liu, D. (2020). Comparison of citrus pectin and apple pectin in conjugation with soy protein isolate (SPI) under controlled dry-heating conditions. *Food Chemistry*, 309, 125501.
22. Golkar, A., Taghavi, S. M., & Aghili Dehnavi, F. (2018). The emulsifying properties of Persian gum (*Amygdalus scoparia* Spach) as compared with gum Arabic. *International Journal of Food Properties*, 21(1), 416-436.
23. Cheng, Y. H., Tang, W. J., Xu, Z., Wen, L., & Chen, M. L. (2018). Structure and functional properties of rice protein–dextran conjugates prepared by the Maillard reaction. *International Journal of Food Science and Technology*, 53(2), 372-380.

24. Dufour, É. (2009). Principles of infrared spectroscopy. *Infrared spectroscopy for food quality analysis and control*, 1-27.
25. Tan, T. C., AlKarkhi, A. F., & Easa, A. M. (2012). Assessment of the ribose-induced Maillard reaction as a means of gelatine powder identification and quality control. *Food Chemistry*, 134(4), 2430-2436.
26. Kato, A. K. I. O. (2002). Industrial applications of Maillard-type protein-polysaccharide conjugates. *Food Science and Technology Research*, 8(3), 193-199.
27. Kouravand, F., Shahidi, F., Koocheki, A., & Fathi, M. (2024). Characterization and emulsifying properties of whey protein isolate-basil seed gum conjugates prepared by Maillard reaction. *Journal of dispersion science and technology*, 45(11), 2226-2239.
28. De Oliveira, F. C., Coimbra, J. S. D. R., De Oliveira, E. B., Zuñiga, A. D. G., & Rojas, E. E. G. (2016). Food protein-polysaccharide conjugates obtained via the Maillard reaction: A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(7), 1108-1125.
29. 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(6), 1007-1014.
30. Consoli, L., Dias, R. A., Rabelo, R. S., Furtado, G. F., Sussulini, A., Cunha, R. L., & Hubinger, M. D. (2018). Sodium caseinate-corn starch hydrolysates conjugates obtained through the Maillard reaction as stabilizing agents in resveratrol-loaded emulsions. *Food Hydrocolloids*, 84, 458-472.
31. Li, Y., Zhong, F., Ji, W., Yokoyama, W., Shoemaker, C. F., Zhu, S., & Xia, W. (2013). Functional properties of Maillard reaction products of rice protein hydrolysates with mono-, oligo-and polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 53-60.
32. Hussain, A., Hussain, M., Ashraf, W., Karim, A., Aqeel, S. M., Khan, A., ... & Lianfu, Z. (2024). Preparation, characterization and functional evaluation of soy protein isolate-peach gum conjugates prepared by wet heating Maillard reaction. *Food Research International*, 192, 114681.
33. Sedaghat Doost, A., Nasrabadi, M. N., Goli, S. A. H., Van Troys, M., Dubruel, P., De Neve, N., & Van der Meeren, P. (2020). Maillard conjugation of whey protein isolate with water-soluble fraction of almond gum or flaxseed mucilage by dry heat treatment. *Food Research International*, 128, 108779.
34. Gu, F. L., Kim, J. M., Abbas, S., Zhang, X. M., Xia, S. Q., & Chen, Z. X. (2010). Structure and antioxidant activity of high molecular weight Maillard reaction products from casein–glucose. *Food Chemistry*, 120(2), 505-511.
35. Yang, C., Liu, J., Han, Y., Wang, B., Liu, Z., Hu, H., ... & Wang, J. (2023). Fabrication of polyphenol-pumpkin seed protein isolate (PSPI) covalent conjugate microparticles to protect free radical scavenging activity of polyphenol. *Food Bioscience*, 55, 102982.
36. Bashir, M., & Haripriya, S. (2016). Assessment of physical and structural characteristics of almond gum. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93, 476-482.
37. Lopez-Torrez, L., Nigen, M., Williams, P., Doco, T., & Sanchez, C. (2015). Acacia senegal vs. Acacia seyal gums—Part 1: Composition and structure of hyperbranched plant exudates. *Food Hydrocolloids*, 51, 41-53.
38. Dufour, É. (2009). Principles of infrared spectroscopy. *Infrared spectroscopy for food quality analysis and control*, 1-27.
39. Hashemi, K., & Hosseini, E. (2021). The stabilizing and prebiotic potential of water-soluble phase of bitter almond gum exudate in probiotic yogurt drink. *Carbohydrate Polymers*, 255, 117395.

40. Uriarte-Montoya, M. H., Santacruz-Ortega, H., Cinco-Moroyoqui, F. J., Rouzaud-Sández, O., Plascencia-Jatomea, M., & Ezquerro-Brauer, J. M. (2011). Giant squid skin gelatin: Chemical composition and biophysical characterization. *Food Research International*, 44(10), 3243-3249.
41. Qiu, J., Zheng, Q., Fang, L., Wang, Y., Min, M., Shen, C., ... & Xiong, C. (2018). Preparation and characterization of casein-carrageenan conjugates and self-assembled microcapsules for encapsulation of red pigment from paprika. *Carbohydrate Polymers*, 196, 322-331.
42. Ma, X., Wang, D., Chen, W., Ismail, B. B., Wang, W., Lv, R., & Liu, D. (2018). Effects of ultrasound pretreatment on the enzymolysis of pectin: Kinetic study, structural characteristics and anti-cancer activity of the hydrolysates. *Food Hydrocolloids*, 79, 90-99.
43. Rahimi, P., Hosseini, E., Rousta, E., & Bostar, H. (2021). Digestibility and stability of ultrasound-treated fish oil emulsions prepared by water-soluble bitter almond gum glycated with caseinate. *Lwt*, 148, 111697.
44. Wong, B. T., Day, L., McNaughton, D., & Augustin, M. A. (2009). The effect of maillard conjugation of deamidated wheat proteins with low molecular weight carbohydrates on the secondary structure of the protein. *Food Biophysics*, 4(1), 1-12.
45. Bi, B., Yang, H., Fang, Y., Nishinari, K., & Phillips, G. O. (2017). Characterization and emulsifying properties of β -lactoglobulin-gum Acacia Seyal conjugates prepared via the Maillard reaction. *Food chemistry*, 214, 614-621.
46. Peng, X., Ji, Y., Zhao, K., & Shen, X. (2025). Conjugation of quinoa protein with saccharide of diverse molecular mass prepared by Maillard reaction: Structural and functional properties. *Food Research International*, 117323.
47. Qi, P. X., Xiao, Y., & Wickham, E. D. (2017). Changes in physical, chemical and functional properties of whey protein isolate (WPI) and sugar beet pectin (SBP) conjugates formed by controlled dry-heating. *Food Hydrocolloids*, 69, 86-96.
48. Ye, Z., Gan, S., Wang, J., Yang, F., & Dong, G. (2025). Conjugation of flaxseed protein and plant polysaccharides: Process optimization, structural characterization and technical-function evaluation. *Food Hydrocolloids*, 166, 111371.
49. Kutzli, I., Weiss, J., & Gibis, M. (2021). Glycation of plant proteins via maillard reaction: reaction chemistry, technofunctional properties, and potential food application. *Foods*, 10(2), 376.
50. Chen, W., Ma, X., Wang, W., Lv, R., Guo, M., Ding, T., ... & Liu, D. (2019). Preparation of modified whey protein isolate with gum acacia by ultrasound maillard reaction. *Food Hydrocolloids*, 95, 298-307.
51. McClements, D. J. (2007). Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability. *Critical reviews in food science and nutrition*, 47(7), 611-649.
52. Dickinson, E. (2019). Strategies to control and inhibit the flocculation of protein-stabilized oil-in-water emulsions. *Food hydrocolloids*, 96, 209-223.
53. Bučko, S. Đ., Katona, J. M., Popović, L. M., Vaštag, Ž. G., & Petrović, L. B. (2016). Functional properties of pumpkin (*Cucurbita pepo*) seed protein isolate and hydrolysate. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 81(1), 35-46.
54. Sun, Y., Wang, Q., Li, C., Wang, Y., Mao, Y., Yang, C., & Li, Y. (2024). Preparation of pumpkin seed protein isolate nanoparticles by heat-assisted pH-shifting: Enhanced emulsification performance and dispersibility. *Journal of Food Engineering*, 377, 112087.
55. Lam, A. C. Y., Can Karaca, A., Tyler, R. T., & Nickerson, M. T. (2018). Pea protein isolates: Structure, extraction, and functionality. *Food Reviews International*, 34(2), 126-147.
56. Dawa, Q., Hua, Y., Chamba, M. V. M., Masamba, K. G., & Zhang, C. (2014). Effect of xanthan and arabic gums on foaming properties of pumpkin (*Cucurbita pepo*) seed protein isolate. *Journal of food research*, 3(1), 87.

57. Damodaran, S. (2005). Protein stabilization of emulsions and foams. *Journal of food science*, 70(3), R54-R66.

Evaluation of the Structural and Functional Properties of Conjugates Prepared from Pumpkin (*Cucurbita pepo*) Seed Protein Isolate and Persian Gum

Background and Objectives: Plant proteins are predominantly globular storage proteins with high molecular weight. Their application in food formulations is often restricted by their rigid structure, which leads to poor solubility, weak emulsifying ability, and limited foaming capacity. Consequently, efficient strategies to tailor the structure of plant proteins are required to enhance their functionality and expand their industrial applications. In recent years, the Maillard reaction has been widely recognized as a natural and safe approach for conjugating proteins with carbohydrates, enabling structural modification under controlled conditions without the use of chemical additives. This study aimed to prepare and investigate the structural and functional properties of conjugates derived from pumpkin seed protein isolate and the soluble fraction of Persian gum at different ratios (1:1, 1:3, and 3:1). The findings of this study could facilitate the development of novel functional ingredients with broad applications in the food industry.

Materials and Methods: Pumpkin seed protein isolate-Soluble fraction Persian gum conjugates were prepared via the dry heating method at 60 °C and 75% relative humidity for 48 h at protein-to-gum ratio of 1:1, 1:3, and 3:1. The degree of conjugation or substitution of free amino groups during the Maillard reaction was quantified using the ortho-phthalaldehyde (OPA) method. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy and sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) were performed to confirm the occurrence of the Maillard reaction. Additionally, color parameters, emulsifying properties (emulsifying activity index and emulsion stability), particle size, zeta potential of emulsions, and foaming properties (foaming capacity and foaming stability) were evaluated.

Results: Covalent interactions between Pumpkin seed protein isolate– Soluble fraction Persian gum via the Maillard reaction were confirmed by OPA analysis, FTIR spectra, and SDS-PAGE profiles. Among the different ratios, the 1:3 Pumpkin seed protein isolate– Soluble fraction Persian gum conjugate exhibited the highest zeta potential (-41.35 ± 0.81 mV), emulsifying activity (14.19 ± 0.18 m²/g), emulsion stability ($67.57 \pm 1.52\%$), foam capacity ($36.23 \pm 0.23\%$), and foam stability ($27.53 \pm 1.01\%$) ($p \leq 0.05$). These results were consistent with the highest degree of conjugation observed for this ratio. In general, the results of different evaluations showed that the produced conjugates exhibited better functional properties compared with the native protein.

Conclusion: Conjugation of pumpkin seed protein isolate with the soluble fraction of Persian gum via the Maillard reaction significantly enhanced emulsifying and foaming properties, as well as modified particle size and zeta potential of the resulting emulsions, compared to the unmodified protein. This process yields protein–polysaccharide structures with improved functional properties, which can be effectively incorporated into a wide range of food products, including beverages, bakery items, and dairy products.

Keywords: Maillard reaction, Persian gum, Pumpkin seed protein isolate, Functional properties, Conjugate