

## Changes of Physico-Chemical Properties of Whey Protein after Denaturation, Enzymatic Hydrolysis and Cross-Linking

HIMAN NOURBAKHSH<sup>1\*</sup>, ZAHRA EMAM-DJOMEH<sup>2</sup>

1. Department of Food Science & Engineering, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

2. Department of Food Science and Engineering, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

(Received: May. 6, 2019- Revised: July. 2, 2019- Accepted: July. 14, 2019)

### ABSTRACT

In the current research, physico-chemical properties of whey protein isolate (WPI) and its resulting compounds including denatured whey protein isolate (DWPI), cross-linked whey protein isolate (CWPI), whey protein hydrolysate (WPH) and cross-linked whey protein hydrolysate (CWPH) were analyzed. Enzymatic hydrolysis and cross-linking were performed by pepsin (at 37°C for 30 min) and transglutaminase (at 50°C for 20 h), respectively. The obtained results stated that, by moderate heat, DWPI had smaller average size (44 nm) and more zeta-potential rather than native WPI. Intensity of the number of molecules with higher average particle size has been reduced by cross-linking of both DWPI and WPH using transglutaminase. Also, the antioxidant activity of WPH was increased from 0.398 to 0.519 through cross-linking and making larger peptide chain. The result of fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) indicated the enzymatic cross-linking owing to the formation of new C–N bonds between the  $\alpha$ -carbon of lysine and the primary amine group of glutamine displaced the corresponding band at both CWPI and CWPH samples.

**Keywords:** Particle size, Transglutaminase, Pepsin, Antioxidant activity

## تغییرات فیزیکوشیمیایی ایزوله پروتئین آب پنیر پس از واسرشته شدن، آبکافت آنزیمی و درهم تنیدن

هیمن نوربخش<sup>۱\*</sup>، زهرا امام جمعه<sup>۲</sup>

۱. گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

۲. گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده مهندسی و فن‌آوری کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی،

دانشگاه تهران، کرج، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۲/۱۶ - تاریخ بازنگری: ۱۳۹۸/۴/۱۱ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۸/۴/۲۳)

### چکیده

در مطالعه اخیر، خصوصیات فیزیکوشیمیایی ایزوله پروتئین آب پنیر و ترکیبات حاصله از آن شامل پروتئین آب پنیر واسرشته، پروتئین آب پنیر درهم تنیده، آبکافت پروتئین آب پنیر و آبکافت پروتئین آب پنیر درهم تنیده مورد بررسی قرار گرفت. آبکافت آنزیمی و فرآیند در هم تنیدن به ترتیب توسط آنزیم پیپسین (۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس) و آنزیم ترانس گلوتامیناز (۲۰ ساعت در دمای ۵۰ درجه سلسیوس) انجام پذیرفت. نتایج بدست آمده نشان داد پروتئین آب پنیر واسرشته شده توسط حرارت متوسط اندازه کمتر (۴۴ نانومتر) و پتانسیل زتا (-۱۹) بیشتری نسبت به پروتئین بکر داشته است. ایجاد اتصالات عرضی توسط ترانس گلوتامیناز نیز شدت جمعیت مولکول‌های با متوسط اندازه بیشتر را در هر دو نمونه پروتئین واسرشته و آبکافت شده کاهش داده است. همچنین قدرت پاداکسیدانی آبکافت پروتئین آب پنیر در طی در هم تنیدن و افزایش طول زنجیره پپتیدی از ۰/۳۹۸ به ۰/۵۱۹ افزایش پیدا کرده بود. نتایج طیف سنجی فروسرخ تبدیل فوریه نشان داد که درهم تنیدن آنزیمی به دلیل تشکیل باندهای جدید C=N بین کربن آلفا لیزین و گروه آمین نوع اول گلوتامین، محل پیک مربوطه را در هر دو نمونه پروتئین آب پنیر درهم تنیده و آبکافت پروتئینی درهم تنیده جابه‌جا کرده است.

**واژه‌های کلیدی:** اندازه ذره، ترانس گلوتامیناز، پیپسین، توان پاداکسیدانی

### مقدمه

اهمیت تکنولوژیکی و تغذیه‌ای پروتئین‌های آب پنیر تمرکز بسیاری از پژوهش‌های اخیر را به سمت خود سوق داده است، به گونه‌ای که مطالعات فراوانی روی فرآیندهای تولید، خالص‌سازی، شناسایی و بکارگیری آن‌ها در صنایع غذایی و دارویی صورت گرفته است (Adjonu et al., 2013). این پروتئین بصورت ایزوله پروتئینی آب پنیر<sup>۱</sup> (WPI) نیز عرضه می‌شود که خلوص بالای ۹۰ درصد دارد. ایزوله پروتئین آب پنیر عمدتاً ترکیبی از بتالاکتوگلوبولین ( $\beta$ -Lg، حدود ۶۰ درصد)، آلفالاکتالومین ( $\alpha$ -La، حدود ۲۲ درصد)، سرم آلبومین گاوی (BSA، حدود ۵/۵ درصد) و ایمونوگلوبولین‌ها (Ig، حدود ۹/۱ درصد) است (Ye et al., 2019). همچنین نشان داده شده است که پروتئین‌های آب پنیر حاوی انواع پپتیدهای زیست فعال با خصوصیات چندگانه زیست کنش‌گری شامل فعالیت ضد بیماری‌های قلبی-عروقی، تقویت سیستم ایمنی و اثرات پاد اکسیدانی، پاد فشار خونی، ضد

دیابتی و ضد آلرژیکی است (Abbaspourrad, 2017) & (Madureira et al., 2010; Madadlou). این پپتیدها می‌توانند در طول هضم پروتئین‌ها توسط آنزیم‌های تجزیه کننده مانند کیموتریپسین، پیپسین و تریپسین در داخل بدن و همچنین آبکافت آنزیمی در شرایط آزمایشگاهی رها شوند (Adjonu et al., 2013). آبکافت آنزیمی در شرایط آزمایشگاهی متداول‌ترین شیوه تولید پپتیدهای زیست فعال می‌باشد و در این حالت امکان کنترل بالا روی فرآیند تجزیه وجود دارد.

ایجاد اتصالات عرضی (درهم تنیدن)<sup>۲</sup> یکی از روش‌های معمول برای بهبود خواص کاربردی پروتئین‌ها و فراهم ساختن آنها جهت استفاده در کارکردهای گوناگون است. حضور گروه‌های کربوکسیل و آمین در مولکول‌های پروتئین، توانایی ایجاد اتصالات عرضی را در آنها ممکن ساخته است (Wang et al., 2013). استفاده از آنزیم ترانس گلوتامیناز، متداول‌ترین روش جهت ایجاد اتصالات عرضی در پروتئین‌ها است. ترانس گلوتامیناز یک

\* نویسنده مسئول: h.nourbakhsh@uok.ac.ir

صورت نگرفته است. شناخت خصوصیات فیزیکوشیمیایی WPI و ترکیبات ساخته شده از آن می تواند به محققین در بکارگیری بهتر این ترکیبات در پژوهش های آتی و تفسیر رخدادهای شیمیایی مربوطه کمک بسزایی کند.

### مواد و روش ها

ایزوله پروتئین آب پنیر (DI-9224) با خلوص ۹۲ درصد و چربی با لاکتوز کمتر از ۰/۲ درصد توسط شرکت Arla Food Ingredient (ویبایی، دانمارک) تأمین گردید. ترانس گلوتامیناز (فعالیت  $\leq 1500$  واحد به ازاء هر گرم)، پپسین (فعالیت  $\leq 2500$  واحد به ازاء هر گرم)، آفتالیدآلدهاید (OPA) و بتا مرکاپتو اتانول از شرکت Sigma-Aldrich خریداری شد. سایر مواد شیمیایی با درجه خلوص آزمایشگاهی از شرکت Merck تهیه گردیدند.

#### آماده سازی محلول ایزوله پروتئین آب پنیر

پودر WPI در آب مقطر (۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر) حاوی سدیم آزید (۰/۲ میلی گرم بر میلی لیتر) به عنوان عامل ضد میکروبی حل شد. محلول پروتئینی با تکانش ۵۰۰ دور در دقیقه و در دمای محیط (۲۷-۲۵ درجه ی سلسیوس) به مدت ۲ ساعت هم زنی و سپس به منظور آبدار شدن کامل پروتئین در دمای ۴ درجه ی سلسیوس به مدت یک شب نگهداری شد. پس از آن، محلول تهیه شده جهت تهیه پروتئین آب پنیر واسرشته<sup>۴</sup> (DWPI) در بن ماری به مدت ۵ دقیقه در دمای ۸۰ درجه ی سلسیوس حرارت دهی و بلافاصله با قرار دادن در زیر جریان آب سرد تا دمای محیط سرد گردید (Bagheri et al., 2014).

#### آبکافت پروتئین آب پنیر

برای تهیه آبکافت پروتئینی آب پنیر<sup>۴</sup> (WPH)، pH محلول پروتئینی با استفاده از اسید کلریدریک ۲ مولار روی ۲ تنظیم و آنزیم پپسین با نسبت وزنی ۱:۱۶۰ (آنزیم:سوبسترا) به آن اضافه گردید. سپس محلول تهیه شده با تکانش ۱۲۰ دور در دقیقه در ۳۷ درجه ی سلسیوس و به مدت ۳۰ دقیقه هم زنی شد. در نهایت آنزیم پپسین، با افزایش pH محلول آبکافته به ۸ با استفاده از سدیم هیدروکسید ۲ مولار و گرمادهی در ۹۰ درجه ی سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه غیر فعال شد.

تهیه پروتئین آب پنیر در هم تنیده<sup>۵</sup> (CWPI) و آبکافت پروتئین آب پنیر در هم تنیده<sup>۶</sup> (CWPB)

درهم تنیدن آنزیمی هر دو محلول WPI و WPH با استفاده از

انتقال دهنده آسپیل با شماره کمیسیون آنزیم<sup>۱</sup> ۲,۳,۲,۱۳ است (Jiang et al., 2019). این آنزیم انتقال آسپیل بین آمین های نوع اول (از جمله گروه اپسیلون آمینوی ( $\epsilon$ -amino) لیزین (به عنوان گیرنده آسپیل) و گروه گاما کربوکسی آمید ( $\gamma$ -carboxamide) گلوتامین (به عنوان دهنده آسپیل) را کاتالیز می کند. در نهایت به علت تشکیل پیوندهای برون و درون مولکولی<sup>۲</sup>  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)-lysine، مولکول های پروتئینی الیگومریزه می شوند (Agyare, Damodaran & 2013; Gaspar et al., 2015). این واکنش باعث ایجاد تغییراتی در آب گریزی سطح مولکول های پروتئین و حلالیت آنها می شود و بنابراین سایر خصوصیات کاربردی پروتئین مانند ژلاسیون، امولسیون سازی، تشکیل کف و ویسکوزیته، که با این ویژگی ها در ارتباط مستقیم هستند، دستخوش تغییر قرار خواهند گرفت (Shao et al., 2018).

Eissa et al. (2004) ایزوله پروتئینی آب پنیر تیمار شده با آنزیم ترانس گلوتامیناز را برای تهیه یک ژل پروتئینی با pH پایین مورد استفاده قرار دادند. آنها از این طریق موفق به ساخت ژل پروتئینی با مدول الاستیسته بالاتر در مقایسه با خود ایزوله پروتئین آب پنیر شدند. (Gulseren et al., 2012) از ایزوله پروتئین آب پنیر برای ساخت نانو ذرات پروتئینی با قابلیت درون پوشانی ذرات روی و امکان تأمین نیاز روزانه یک فرد بزرگسال به این عنصر بهره بردند. بر اساس گزارش این محققین، نانو ذرات بدست آمده دارای کارایی درون پوشانی بالا و در دمای ۲۲ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ روز پایدار می باشد. (Goudarzi et al., 2015) نوشیدنی جدید آب سیب محتوی ایزوله پروتئین آب پنیر و آبکافت پروتئین آب پنیر را فرموله کردند. آنها تلاش کردند که موانع تکنولوژیکی محدود کننده توسعه نوشیدنی آب سیب محتوی پروتئین آب پنیر را برطرف کنند. (Oancea et al., 2018) از ایزوله پروتئین آب پنیر برای درون پوشانی آنتوسیانین استخراج شده از آلبالو استفاده کردند. آنها گزارش کردند که پروتئین آب پنیر از آنتوسیانین در برابر شرایط هاضم دستگاه گوارش محافظت و در داخل روده کوچک آن را رها کرده است.

همانطور که از مروری بر منابع می توان دریافت، WPI در ساخت نانوذرات، فرمولاسیون محصولات غذایی مختلف و پایداری سازی، مورد آزمون و مطالعه قرار گرفته است. با این وجود، مطالعه متمرکزی در ارتباط با اندازه مولکول، میزان پایداری محلول، توان پادکسدانی و تغییرات شیمیایی پروتئین آب پنیر پس از واسرسته شدن، آبکافت شدن و درهم تنیدن به صورت جامع

4- Whey protein hydrolysate

5- Cross-linked whey protein isolate

6- Cross-linked whey protein hydrolysate

1- Enzyme commission

2- Intra- and intermolecular

3- Denatured whey protein isolate

$$DH\% = \frac{h}{h_{tot}} \times 100 \quad (1)$$

$h$  تعداد گروه‌های آمینی آزاد شده و  $h_{tot}$  تعداد کل پیوندهای پپتیدی به ازاء هر اکی‌والانت پروتئین می‌باشد. برای پروتئین آب پنیر  $h_{tot}$  برابر با  $8/8$  است (Nielsen *et al.*, 2001).

#### اندازه ذره و پتانسیل زتا

تکنیک پراش دینامیکی نور (DLS model Brookhaven Instruments Corp, Zeta PALS, آمریکا) برای اندازه‌گیری قطر و پتانسیل زتا (ζ) محلول‌های پروتئینی و پپتیدی بکار رفت. تمام اندازه‌گیری‌ها در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس، در محیط آبی، با زاویه ۹۰ درجه و طول موج ۶۵۷ نانومتر انجام و نتایج بر اساس قطر مؤثر و توزیع اندازه ذرات بیان شد.

#### طیف‌سنجی فروسرخ تبدیل فوریه<sup>۲</sup> (FTIR)

در این آزمون تغییرات ساختار شیمیایی نمونه‌های WPI درهم تنیده، WPH و WPH درهم تنیده در محدوده‌ی طول موج ۶۰۰ تا ۴۰۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه بازتاب کل تقلیل‌یافته طیف‌سنجی فروسرخ تبدیل فوریه (ATR-FTIR model Spectrum 100, PerkinElmer, آمریکا) بررسی شد.

#### تجزیه و تحلیل آماری

نتایج بصورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار گزارش شدند. تجزیه آماری با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و مقایسه میانگین با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن توسط نرم‌افزار SPSS (ورژن ۲۲) انجام گرفت. آزمون‌های شیمیایی سه بار تکرار شدند.

#### نتایج و بحث

به برخی از ویژگی‌های پروتئین آب‌پنیر واسرشت و درهم تنیده شده در جدول ۱ اشاره شده است. پروتئین بکر دارای متوسط اندازه ۸۹ نانومتر و پتانسیل زتای ۱۵- میلی ولت بوده است. واسرشته‌کردن حرارتی قطر هیدرودینامیک پروتئین را به حدود ۴۴ نانومتر کاهش و باعث افزایش بزرگی مقدار پتانسیل زتا (۱۹-) شده است.

متوسط اندازه حدود ۴۰ نانومتر نیز توسط Vahedifar *et al.* (2018) برای ایزوله پروتئینی واسرشت گزارش شده است. این‌طور استدلال می‌شود که در اثر تیمار حرارتی ۸۰ درجه سلسیوس، بخشی از فعل و انفعالات آبگریز در بین پروتئین‌ها از بین رفته که با افزایش دافعه الکترواستاتیک میان مولکول‌های پروتئین در چنین دمای بالایی و شرایط قلیایی (pH = ۸) همراه بوده است، در نتیجه منجر به تفکیک ابرمولکول‌های پروتئین به

ترانس‌گلوتامیناز و در شرایط بهینه معرفی شده (Eissa *et al.*, 2004) اجرا شد. pH محلول پروتئینی/پپتیدی با استفاده از سدیم هیدروکسید ۲ مولار روی ۸ تنظیم و آنزیم ترانس‌گلوتامیناز با نسبت ۶۲۵ میکرولیتر به ازاء هر ۱۰۰ گرم محلول به آن اضافه شد. محلول به دست آمده به منظور درهم تنیده شدن در دمای ۵۰ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۲۰ ساعت و با تکانش ۱۲۰ دور در دقیقه آنکوبه شد (Madadlou *et al.*, 2014). در نهایت فعالیت آنزیم با حرارت‌دهی محلول پروتئینی/پپتیدی در دمای ۶۰ درجه-ی سلسیوس و به مدت ۱۵ دقیقه متوقف شد.

#### اندازه‌گیری قدرت کاهندگی

فعالیت پاد اکسیدانی محلول پروتئینی و پپتیدی با استفاده از آزمون سنجش قدرت کاهندگی اندازه‌گیری شد (Yildirim *et al.*, 2001). به‌طور خلاصه، ۱ میلی‌لیتر از نمونه‌های رقیق‌شده (۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به ۲/۵ میلی‌لیتر فسفات بافر (۰/۲ مولار، pH = ۶/۶) و ۲/۵ میلی‌لیتر پتاسیم فری سیانید (۱۰ گرم در لیتر) اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه‌ی سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری شد. سپس، ۲/۵ میلی‌لیتر تری-کلرواستیک اسید (۱۰۰ گرم بر لیتر) به آن افزوده و در سرعت ۶۰۰۰ برابر گرانش زمین به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (۸k, Sigma, SciQuip Ltd, انگلستان) شد. پس از آن، ۲/۵ میلی‌لیتر از مایع روشن‌آور با ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر فریک کلرید (۱ گرم بر لیتر) مخلوط شد. شدت جذب هر نمونه با استفاده از اسپکتروفوتومتر فرابنفش-مرئی (CE2502, Cecil Instrument, انگلستان) در طول موج ۷۰۰ نانومتر خوانش شد. افزایش جذب بیانگر افزایش توان احیاکنندگی است (Liu & Zhong, 2013).

#### درجه آبکافت

درجه آبکافت<sup>۱</sup> (DH) با استفاده از تعیین افزایش گروه‌های آمینی آزاد در هیدرولیزات حاصله از طریق واکنش با OPA اندازه‌گیری شد (Nielsen *et al.*, 2001). برای تهیه معرف OPA تازه، ۴۰ میلی‌گرم پودر OPA در ۱ میلی‌لیتر اتانل حل و سپس ۲۵ میلی-لیتر بافر بوراکس (۱۰۰ میلی‌مولار)، ۱۰۰ میکرولیتر بتامرکاپتواتانل و ۲/۵ میلی‌لیتر محلول SDS (۲۰ درصد وزنی/وزنی) به آن اضافه شد. در نهایت، ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه رقیق شده (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با ۱/۵ میلی‌لیتر از معرف مخلوط و پس از ۲۰ دقیقه آنکوباسیون در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس، جذب آن در طول موج ۳۴۰ نانومتر خوانش شد.

<sup>۲</sup>- Fourier-transform Infrared Spectroscopy

۱- Degree of hydrolysis

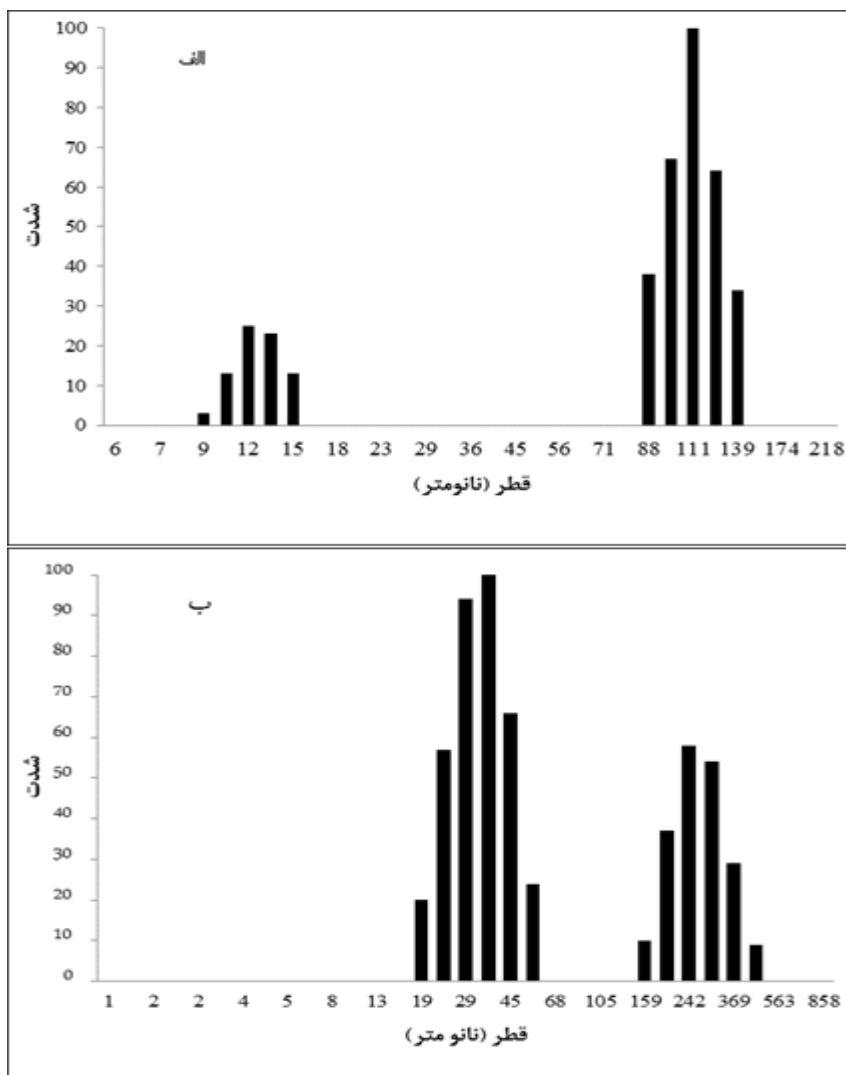
می‌شود، دو دامنه توزیع اندازه ذرات در پروتئین آب پنیر واسرشت یکی با متوسط اندازه حدود ۱۲/۲ نانومتر و شدت پایینتر و دیگری با متوسط اندازه ۱۱۱/۲ نانومتر و شدت بالاتر وجود دارند.

واحدهای کوچکتر شده است. متوسط اندازه پروتئین‌های واسرشته‌شده حرارتی پس از درهم‌تنیدگی آنزیمی آنها، اندکی افزایش پیدا کرده است. همانطور که در شکل ۱ (الف و ب) مشاهده

جدول ۱- برخی از ویژگی‌های پروتئین آب پنیر بکر، واسرشت و درهم تنیده شده، آبکافت پروتئینی آب پنیر و آبکافت پروتئین آب پنیر درهم تنیده شده

نمونه‌ها	متوسط قطر (نانومتر)	چند اندازه‌گی	پتانسیل زتا (میلی‌ولت، pH=۸)	توان کاهندگی (جذب در ۷۰۰ نانومتر)
WPI	$112/4 \pm 1/89$	$0/67 \pm 0/08^a$	$-15/4 \pm 2/3^d$	$0/190 \pm 0/002^d$
DWPI	$44/3 \pm 4/4^c$	$0/70 \pm 0/08^a$	$-19/1 \pm 1/0^c$	$0/280 \pm 0/001^c$
CWPI	$49/3 \pm 1/3^b$	$0/22 \pm 0/01^b$	$-38/7 \pm 1/9^a$	$0/277 \pm 0/003^c$
WPH	$25/7 \pm 3/3^e$	$0/78 \pm 0/07^a$	$-22/9 \pm 1/1^b$	$0/398 \pm 0/006^b$
CWPH	$39/14 \pm 2/1^d$	$0/3 \pm 0/01^b$	$-40/6 \pm 2/6^a$	$0/519 \pm 0/005^a$

WPI: ایزوله پروتئین آب پنیر؛ DWPI: پروتئین آب پنیر واسرشت؛ CWPI: پروتئین آب پنیر درهم تنیده شده؛ WPH: آبکافت پروتئین آب پنیر با درجه آبکافت (DH)  $8/37 \pm 1/65$ ؛ آبکافت پروتئین آب پنیر درهم تنیده شده. حروف یکسان در هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن می باشد ( $P < 0/05$ ).



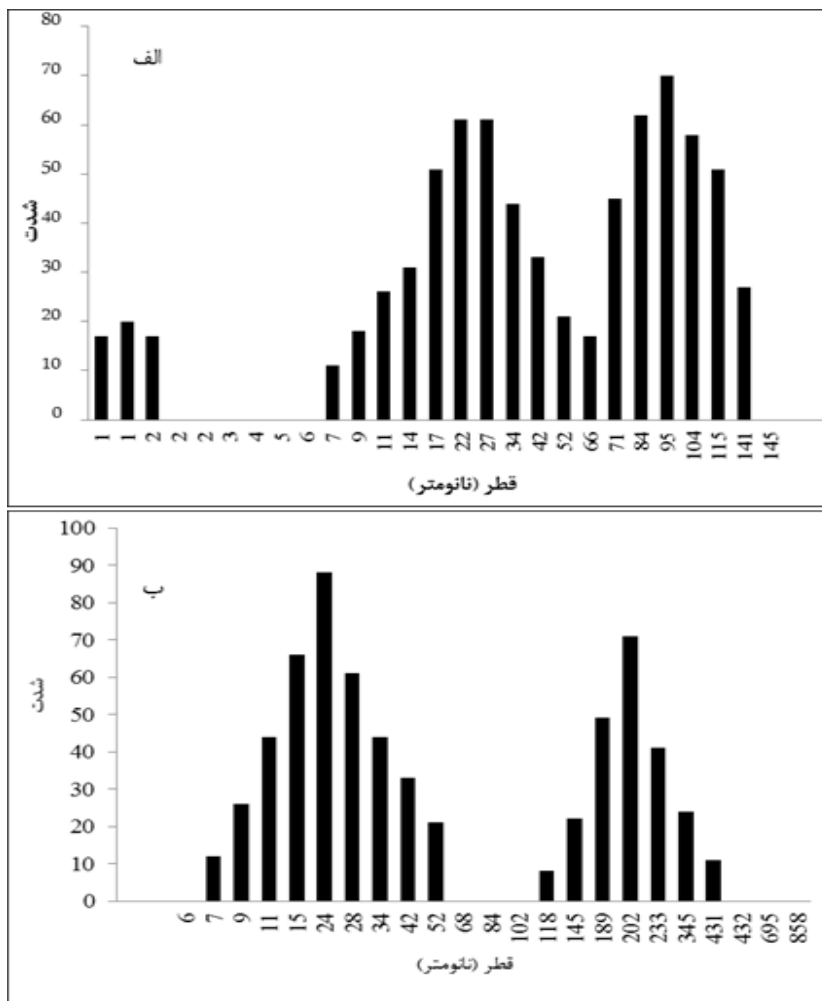
شکل ۱- توزیع اندازه قطر مولکول‌های (الف) پروتئین آب پنیر واسرشته شده و (ب) پروتئین آب پنیر واسرشت درهم تنیده شده

آب پنیر باعث آزاد میزان معنی‌دار پپتیدهای زنجیر کوتاه می‌شود که به واسطه عدم حضور باقی‌مانده‌های لیزین و گلوتامین در فرآیند درهم‌تنیدن شرکت نخواهند کرد و باعث محدود شدن فعالیت ترانس‌گلوتامیناز می‌گردند. در مورد اسیدهای آمینه pKa گروه کربوکسیل حدود ۲/۴ است در حالی که pKb گروه آمین برابر با ۸/۸ می‌باشد. اندازه‌گیری میزان پتانسیل زتا در pH ۸ بدان معنی است که میزان تفکیک گروه‌های کربوکسیل (به عنوان COO<sup>-</sup>) از پروتئین‌ها در شرایط آزمایشگاهی شده است (جدول ۱). این در حالی است که پیش‌بینی می‌شد در اثر بسپارش توالی-های پپتیدی توان کاهندگی آنها کاهش یابد. در جریان آبکافت، طیف گسترده‌ای از پپتیدهای کوچک و اسیدهای آمینه تولید می‌شوند که می‌توانند موجب افزایش ظرفیت اهداکنندگی الکترون هیدرولیزات گردند (Adjonu et al., 2013). طبق یافته‌های Wu et al. (2003) تغییر در میزان شکستن زنجیرهای پروتئین و اندازه و ترکیب اسیدهای آمینه پپتیدها روی توان پاد اکسیدانی تأثیر گذار هستند. درهم‌تنیدن آنزیمی پپتیدهای احیاکننده ساختار دو پپتیدی و حتی چند پپتیدی ایجاد کرده که در آنها تشکیل ابر الکترونی روی یک بخش از مولکول در اثر از دست دادن الکترون، الکترون‌دوستی دیگر گروه‌های کاهنده را کاهش داده و تمایل آنها را برای اهدا کردن یک پروتون تقویت کرده، در نتیجه منجر به ایجاد ترکیب‌های درون و حتی برون مولکولی رادیکال-رادیکال شده است. این عمل خنثی شدن رادیکال‌های پپتیدی تشکیل شده را امکان‌پذیرتر کرده و بنابراین، مولکول‌های چند پپتیدی در مقایسه با پپتیدهای مجزای درهم‌تنیده نشده دارای توان احیاکنندگی بیشتری بوده‌اند (Bagheri et al., 2014). شمار بیشتر گروه‌های COO<sup>-</sup> نسبت به گروه‌های NH<sub>3</sub><sup>+</sup> در آبکافت پروتئینی در هم تنیده شده نیز می‌تواند در نهایت منجر به افزایش توان کاهندگی Fe<sup>3+</sup> شده باشد.

درهم‌تنیدن آنزیمی هر دو جمعیت، توزیع اندازه ذرات را در این نمونه به مقادیر بالاتر منتقل کرده و همچنین شمار مولکول‌های بزرگتر پروتئین به نفع مولکول‌های کوچکتر کاهش پیدا کرده است (شدت جمعیت مولکول‌های با متوسط اندازه بیشتر کاهش پیدا کرده است). دلیل این امر می‌تواند شدت بالاتر اتصالات عرضی درون مولکولی نسبت به بین مولکولی ایجاد شده توسط ترانس‌گلوتامیناز باشد. همانطور که اشاره شد درهم‌تنیدن آنزیمی باعث افزایش میزان پتانسیل زتای پروتئین حرارت‌دیده شده است (جدول ۱) که به احتمال فراوان به دلیل کاهش شمار گروه‌های آمینی در طول فرآیند درهم‌تنیدن می‌باشد. پتانسیل زتای بزرگتر سبب افزایش دافعه در میان پروتئین‌ها شده و قابلیت انحلال و پایداری آنها را نیز تقویت می‌نماید (Li et al., 2013). Chen et al. (2018) نیز علت بار منفی بیشتر ایزوله پروتئینی آب پنیر درهم‌تنیده در مقایسه با پروتئین آب پنیر بکر را مصرف شدن بخش آمینی و دارای بار مثبت لیزین و سایر آمین‌های نوع اول را در طی واکنش درهم‌تنیدن آنزیمی با ترانس‌گلوتامیناز بیان کردند.

#### ویژگی‌های فیزیکی و تأثیر ترانس‌گلوتامیناز روی آن

برخی از ویژگی‌های آبکافت پروتئین آب پنیر (با استفاده از پپسین) درهم‌تنیده نشده و درهم‌تنیده شده توسط آنزیم ترانس‌گلوتامیناز در جدول ۱ آورده شده است. آبکافت آنزیمی نیز همچون واسرشت کردن حرارتی، متوسط اندازه هیدرودینامیک پروتئین آب پنیر را کاهش و میزان پتانسیل زتای منفی را تقویت کرده است. شکستن مولکول‌های بزرگ پروتئین به توالی‌های کوچکتر پپتیدی علت این کاهش اندازه در قطر می‌باشد. نمودار توزیع اندازه ذرات آبکافت پروتئینی و تیمار درهم‌تنیده آن در شکل ۲ (الف و ب) نمایش داده شده است. همانطور که مشخص است پس از درهم‌تنیدن آنزیمی، توزیع اندازه ذرات به سمت اندازه کوچکتر و شدت بالاتر حرکت کرده است. بنابراین در این ارتباط نیز پیش‌بینی می‌شود که علت آن ایجاد پیوندهای درون مولکولی بیشتر نسبت به پیوندهای برون مولکولی توسط ترانس-گلوتامیناز باشد. نتایج مشابهی توسط Carvalho et al. (2019) روی درهم‌تنیدن آنزیمی ایزوله پروتئین آب پنیر آبکافت شده با آنزیم آلكالاز گزارش شده است. آنها نیز بیان داشتند که فعالیت کاتالیزوری ترانس‌گلوتامیناز منجر به ایجاد اتصالات عرضی درون و برون مولکولی می‌گردد و شدت درهم‌تنیدن بستگی به حضور اسید آمینه‌های لیزین و گلوتامین در پپتیدهای کوچک تشکیل شده دارد. آنها همچنین گزارش کردند که آبکافت وسیع پروتئین



شکل ۲- توزیع اندازه قطر مولکول‌های (الف) آبکافت پروتئین آب پنیر واسرشته شده و (ب) آبکافت پروتئین آب پنیر واسرشته در هم تنیده شده.

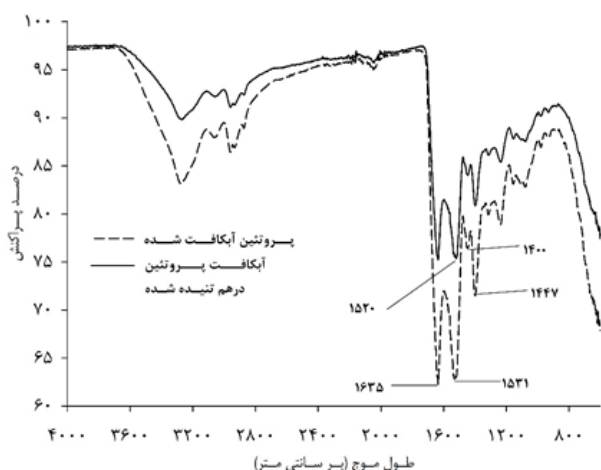
(Kretschmer, 1957).

محدوده اثر انگشت فروسرخ، ۱۸۰۰ تا ۸۰۰ بر سانتی‌متر، برای آنالیز مواد پروتئینی بسیار کاربردی است چرا که در این منطقه گروه‌های تشکیل‌دهنده باند آمیدی (C=O، N-H و C-N) نور جذب می‌کنند (Van der ven *et al.*, 2002). آمید نوع اول (۱۷۰۰-۱۶۰۰ بر سانتی‌متر) حاصل ارتعاشات کششی باند C=O می‌باشد، در حالی که آمید نوع دوم، با جذب از ۱۶۰۰ تا ۱۵۰۰ بر سانتی‌متر، مربوط به تغییر شکل باند N-H و ارتعاشات کششی C-N است (Van der ven *et al.*, 2002). شکل ۳ طیف فروسرخ پروتئین آب پنیر واسرشت و پروتئین آب پنیر در هم تنیده شده را نشان می‌دهد. پیک‌های ناشی از ارتعاشات کششی O-H و C-H برای همه نمونه‌ها به ترتیب در طول موج‌های ۳۲۷۵ و ۲۹۶۲ بر سانتی‌متر مشاهده می‌شود. پیک ۱۶۳۵ بر سانتی‌متر برای همه نمونه‌ها ناشی از ارتعاشات کششی گروه

### آنالیز FTIR

اسپکتروسکوپی فروسرخ اطلاعاتی را در مورد ساختمان دوم پروتئین‌ها فراهم می‌کند. این دستگاه بر اساس تابش پرتو فروسرخ بر نمونه و مشاهده طول موج تابش یافته و جذب شده از ناحیه فروسرخ به وسیله نمونه عمل می‌کند. طیف فروسرخ می‌تواند همچون اثر انگشت در انسان، برای شناسایی نمونه‌ها به کار رود و یا اینکه اطلاعاتی راجع به ساختار یک مولکول بدهد. تمام مولکول‌های فعال در ناحیه فروسرخ دارای دو حرکت ارتعاشی<sup>۱</sup>، کششی<sup>۲</sup> و خمشی<sup>۳</sup> هستند. عدد موج‌های پایین مربوط به ارتعاشات خمشی و عدد موج‌های بالا مربوط به ارتعاشات کششی است. پیوندهای مستحکم‌تر در عدد موجی بالاتری نسب به پیوند-های ضعیف قرار می‌گیرند. همچنین در طیف فروسرخ یک ترکیب، باید به موقعیت و شکل جذب نیز توجه شود

نیز درهم تنیدن آنزیمی تأثیری بر ارتعاشات کششی  $C=O$  (۱۶۳۵ بر سانتی‌متر) در جریان ایجاد اتصالات عرضی بین گلوتامین و لیزین نداشته است؛ اما در اثر تشکیل باندهای جدید  $C-N$ ، باند مربوطه از ۱۵۳۱ بر سانتی‌متر در WPH (درهم تنیده نشده) به ۱۵۲۰ بر سانتی‌متر در WPH درهم تنیده شده جابه‌جا شده است.



شکل ۴- طیف FTIR نانوذرات تهیه‌شده از آبکافت پروتئینی درهم تنیده

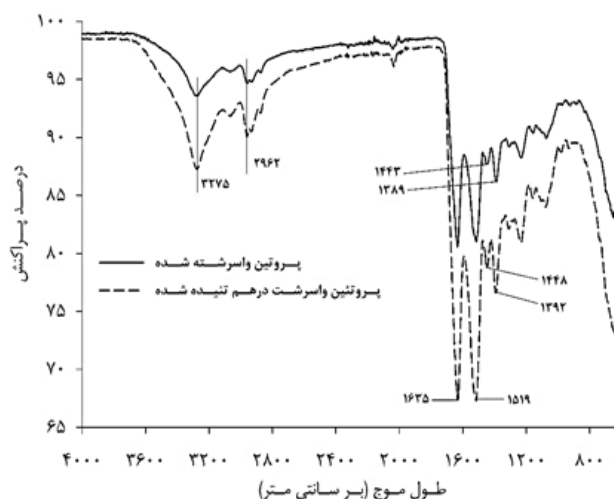
### نتیجه‌گیری کلی

بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی WPI و مشتقات آن بیان‌کننده خصوصیات پاداکسیدانی این ترکیبات است. ضرورت استفاده از پاد اکسیدان‌های طبیعی، با توجه به نگرانی‌هایی که امروزه در مورد استفاده از پاد اکسیدان‌های سنتزی وجود دارد، می‌تواند محققین را در جهت بکارگیری این ترکیبات به عنوان یک منبع پاد اکسیدان طبیعی تشویق کند. نتایج این پژوهش همچنین بیان می‌دارد درهم تنیدن آنزیمی توسط ترانس گلوتامیناز باعث افزایش پل‌های درون مولکولی  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)-lysine در زنجیره‌های پپتیدی شده است. ایجاد این اتصالات عرضی توسط تقویت ساختمان پپتیدی و خاصیت پاداکسیدانی را به همراه داشته است. بنابراین پیشنهاد می‌شود با توجه به محدودیت‌های پپتیدهای زیست فعال در ساخت نانو ذرات از جمله پایین بودن ویژگی‌های محافظت‌کنندگی و پوشاندندگی ذرات ساخته شده از آنها، از پپتیدهای درهم‌تنیده شده در تولید نانوذرات پپتیدی با قابلیت درون‌پوشانی و حامل ترکیبات فراسودمند بهره برده شود.

### REFERENCES

Adjou, R., Doran, G., Torley, P. & Agboola, S. (2013). Screening of whey protein isolate hydrolysates for their dual functionality: influence of heat pre-treatment and enzyme specificity. *Food Chemistry*, 136, 1435-1443.

کربونیل ( $C=O$ ) و خمشی  $NH_2$  بوده و به ساختار مارپیچ آلفای ساختمان دوم پروتئین‌ها نسبت داده می‌شود. بنابراین، درهم تنیدن آنزیمی با وجود اینکه در منطقه نزدیک زنجیره جانبی کربونیل گلوتامین و در واکنش با لیزین پیش می‌رود، تأثیری بر ارتعاشات کششی  $C=O$  نداشته است.



شکل ۳- طیف FTIR نانوذرات تهیه‌شده از (الف) پروتئین واسرشته و (ب) پروتئین درهم تنیده

باندهایی که به ارتعاشات خمشی  $C-H$  و کششی  $C-N$  در امید نوع اول اختصاص داده می‌شوند، معمولاً برای WPI به ترتیب در طول موج‌های ۱۴۵۰ و ۱۴۰۰ بر سانتی‌متر مشاهده می‌گردند (Bagheri *et al.*, 2014)؛ با این حال تخریب بخشی از ساختمان دوم پروتئین‌ها در اثر واسرشته‌شدن حرارتی این باندها را به ۱۴۴۳ و ۱۳۸۹ بر سانتی‌متر منتقل کرده است. Tan *et al.* (2019) نیز ایجاد تغییر در ساختار ثانویه ایزوله پروتئین آب پنیر را پس از فرآیند حرارتی در دمای ۸۰ درجه سلسیوس مشاهده و آن را عامل تغییر در محل و شدت پیک‌های FTIR مربوطه معرفی کردند. درهم تنیدن آنزیمی به دلیل تشکیل باندهای جدید  $C-N$  بین کربن آلفا لیزین و گروه آمین نوع اول گلوتامین محل پیک مربوطه را از ۱۳۸۹ به ۱۳۹۲ بر سانتی‌متر جابه‌جا کرده است. تأثیر درهم تنیدن آنزیمی روی تغییرات شیمیایی زنجیره‌های پلی‌پپتیدی نیز با استفاده از FTIR مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۴). باندهای در محدوده ۱۵۰۰-۱۶۰۰ بر سانتی‌متر مربوط به ارتعاشات کششی  $C-N$  در امید نوع دوم می‌باشد. در این مورد

Bagheri, L., Madadlou, A., Yarmand, M. & Mousavi, M. E. (2014). Potentially bioactive and caffeine-loaded peptidic sub-micron and nanoscalar particles. *Journal of Functional Foods*, 6, 462-469.



- Carvalho, N. C. D., Pessato, T. B., Negrão, F., Eberlin, M. N., Behrens, J. H., Zollner, R. D. L. & Netto, F. M. (2019). Physicochemical changes and bitterness of whey protein hydrolysates after transglutaminase cross-linking. *LWT - Food Science and Technology*, 113, 108291.
- Chen, A., Tanidjaja, I. & Damodaran, S. (2018). Nanostructure and functionality of enzymatically repolymerized whey protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 256, 405–412.
- Damodaran, S. & Agyare, K. K. (2013). Effect of microbial transglutaminase treatment on thermal stability and pH-solubility of heat-shocked whey protein isolate. *Food Hydrocolloids*, 30, 12–18.
- Eissa, A. S., Bisram, S. & Khan, S. A. (2004). Polymerization and gelation of whey protein isolates at low pH using transglutaminase enzyme. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 52, 4456–4464.
- Gaspar, L. & de Goes-Favoni, P. (2015). Action of microbial transglutaminase (MTGase) in the modification of food proteins : a review. *Food Chemistry*, 171, 315–322.
- Goudarzi, M., Madadlou, M., Mousavi, M. E. & Emam-Djomeh, Z. (2015). Formulation of apple juice beverages containing whey protein isolate or whey protein hydrolysate based on sensory and physicochemical analysis. *International Journal of Dairy Technology*, 68, 70–78.
- Gulseren, I., Fang, Y. & Corredig, M. (2012). Zinc incorporation capacity of whey protein nanoparticles prepared with desolvation with ethanol. *Food Chemistry*, 135, 770–774.
- Jiang, Z., Wang, C., Li, T., Sun, D., Gao, H. & Gao, Z. (2019). Effect of ultrasound on the structure and functional properties of transglutaminase-crosslinked whey protein isolate exposed to prior heat treatment. *International Dairy Journal*, 88, 79–88.
- Kretschmer, C. B. (1957). Infrared spectroscopy and optical rotatory dispersion of zein, wheat gluten and gliadin. *The Journal of Physical Chemistry*, 61, 1627–1631.
- Li, C., Zhang, D., Guo, H., Hao, L., Zheng, D., Liu, G., et al. (2013). Preparation and characterization of galactosylated bovine serum albumin nanoparticles for liver-targeted delivery of oridonin. *International Journal of Pharmaceutics*, 448, 79–86.
- Liu, G. & Zhong, Q. (2013). Dispersible and thermal stable nanofibrils derived from glycated whey protein. *Biomacromolecules*, 14, 2146–2153.
- Madadlou, A. & Abbaspourrad, A. (2017). Bioactive whey peptide particles: An emerging class of nutraceutical carriers. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 58, 1468–1477.
- Madadlou, A., Jaberipour, S. & Eskandari, M. H. (2014). Nanoparticulation of enzymatically cross-linked whey proteins to encapsulate caffeine via microemulsification/heat gelation procedure. *LWT - Food Science and Technology*, 57, 725–730.
- Madureira, R., Tavares, T., Gomes, M., Pintado, E. & Malcata, X. (2010). Invited review: physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. *Journal of Dairy Science*, 93, 437–455.
- Nielsen, P. M., Petersen, D. & Dambmann, C. (2001). Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Journal of Food Science*, 66, 642–646.
- Oancea, A., Hasanb, M., Vasilea, A. M., Barbu, V., Enachia, E. & et al. (2018). Functional evaluation of microencapsulated anthocyanins from sour cherries skins extract in whey proteins isolate. *LWT - Food Science and Technology*, 95, 129–134.
- Shao, S., Shen, X. & Guo, M. (2018). Zinc-loaded whey protein nanoparticles prepared by enzymatic cross-linking and desolvation. *International Journal of Food Science and Technology*, 25, 1108–1120.
- Tana, S., Zhonga, C. & Langrisha, T. (2019). Microencapsulation of pepsin in the spray-dried WPI (whey protein isolates) matrices for controlled release. *Journal of Food Engineering*, 263, 147–154.
- Vahedifar, A., Madadlou, A. & Salami, M. (2018). Influence of seeding and stirring on the structural properties and formation yield of whey protein microgels. *International Dairy Journal*, 79, 43–51.
- Van der Ven, C., Muresan, S., Gruppen, H., de Bont, D. B. A., Merck, K. B. & Voragen, A. G. J. (2002). FTIR Spectra of whey and casein hydrolysates in relation to their functional properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6943–6950.
- Wang, W., Zhong, Q. & Hu, Z. (2013). Nanoscale understanding of thermal aggregation of whey protein pretreated by transglutaminase. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 61, 435–446.
- Wu, C., Chen, M. & Shiau, Y. (2003). Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Research International*, 36, 949–957.
- Ye, Q., Woo, M. W. & Selomulya, C. (2019). Modification of molecular conformation of spray-dried whey protein microparticles improving digestibility and release characteristics. *Food Chemistry*, 280, 255–261.
- Yildirim, A., Mavi, A. & Kara, A. A. (2001). Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 49, 4083–4089.