



Comparison of the conjugation interaction of isolated soy protein with gallic acid and tannic acid on its structural properties and antioxidant activity

Sima Mojaher Khorasani ¹, Mehran Aalami ^{2✉}, Morteza Khomeiri ³ and Hoda Shahiri Tabarestani

¹PhD student in Food Science and Technology - Food Engineering, Gorgan university of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

²Professor, Faculty of Food Science and Engineering, Gorgan university of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

³Professor, Faculty of Food Science and Engineering, Gorgan university of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

⁴Associate Professor, Faculty of Food Science and Engineering, Gorgan university of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

✉ Corresponding author: mehranalami@gmail.com

ARTICLE INFO

Article type:

Research Article

Article history:

Received: 2025-05-24

Accepted: 2025-09-13

Published: 2025-09-13

Keywords:

Soy protein isolate, Tannic acid, Gallic acid, Conjugate interaction

ABSTRACT

Background: Covalent interactions between proteins and phenolic acids are recognized as an effective approach to improve the functional properties of plant proteins. Such interactions can enhance the physical, chemical, and biological characteristics of proteins, thereby broadening their applications in various industries.

Aims: This study aimed to investigate the interaction between soy protein isolate (SPI) with gallic acid (GA) and tannic acid (TA), and to evaluate its effects on the structural characteristics and antioxidant activity of SPI.

Methods: GA and TA at concentrations of 5, 10, and 15% (based on protein weight) were reacted with SPI under alkaline conditions (pH=9) to form conjugates. The obtained conjugates were analyzed using OPA spectrophotometry, emulsifying properties (EAI, ESI), antioxidant activity, color measurement, electrophoresis (SDS-PAGE), zeta potential, and Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR).

Results: With increasing GA and TA concentrations up to 10%, the degree of conjugation increased from 28.33% to 64.45% and from 29.52% to 55.66%, respectively, after which it reached a stable level. The EAI and ESI values of SPI-TA conjugates (13.65 and 32.65, respectively) were higher than those of SPI-GA (19.15 and 73.05). Furthermore, increasing GA and TA concentrations up to 10% enhanced the zeta potential (-26.12 and -27.2, respectively) and significantly reduced particle size. Evidence from SDS-PAGE and FTIR confirmed the formation of covalent bonds between SPI and GA/TA.

Conclusion: Among the treatments, SPI-GA 10% and SPI-TA 10% were identified as the optimal formulations.

Extended Abstract

Background: Covalent interactions between proteins and phenolic acids, especially in the realm of plant proteins, represent an effective and practical approach to enhancing the functional and structural properties of proteins. These interactions, which typically occur under alkaline conditions and in the presence of phenolic acids, can improve the physical, chemical, and biological characteristics of proteins, thereby expanding their industrial applications. Among plant proteins, soy protein isolate (SPI) has attracted considerable attention due to its high nutritional value, economic benefits, and environmental advantages. However, its instability against temperature, pH changes, and processing conditions poses significant limitations on its broader use in the food industry. In this context, the use of phenolic acids as protein-modifying agents offers a novel and effective strategy to improve the functional properties of soy protein isolate.

Objective: This study aimed to investigate the covalent interactions between soy protein isolate and two representative phenolic acids, gallic acid (GA) and tannic acid (TA), focusing on their effects on the structural, chemical, and antioxidant activity of the protein. Although gallic acid and tannic acid share structural similarities, they differ in molecular weight and the number of phenolic rings, factors that could influence the extent and type of interaction with the protein. Tannic acid, as a poly-galloyl glucose ester, has a higher molecular weight and contains more phenolic groups, whereas gallic acid has a simpler structure and lower molecular weight.

Methodology: Soy protein isolate was prepared as a 2% aqueous solution and adjusted to alkaline conditions (pH = 9). Subsequently, gallic acid and tannic acid were added to the protein solution at three different concentrations (5%, 10%, and 15% based on protein weight) and allowed to react to form protein-polyphenol conjugates. The reaction was conducted at room temperature with continuous stirring for 24 hours. Afterwards, the samples were dialyzed and freeze-dried to remove unbound phenolic acids, leaving only the formed conjugates.

Results: The degree of conjugation, indicating the extent of covalent bonding between free amino groups of the protein and phenolic groups of the acids, was measured using the Folin–Ciocalteu assay. Results showed that conjugation percentage significantly increased with phenolic acid concentration up to 10%, then plateaued. Notably,

conjugation levels in tannic acid-treated samples were significantly higher than those with gallic acid, attributed to tannic acid's higher molecular weight and greater number of phenolic rings. Increased conjugation indicates more covalent bonds between protein and phenolic acids, leading to enhanced stability and structural modifications of the protein. FTIR spectroscopy revealed significant changes in the amide bands of the protein after reaction. The main Amide A, Amide I, and Amide II bands, associated with carbonyl, NH groups, and protein secondary structure, were altered, indicating changes in protein structure and the formation of new covalent bonds. These findings confirm that phenolic acids reacted with protein functional groups and modified its structure. SDS-PAGE electrophoresis supported the covalent bond formation evidence. Protein bands in conjugated samples shifted towards higher molecular weights compared to pure protein, reflecting the attachment of phenolic molecules and increased molecular mass. This band shift confirms the formation of protein-polyphenol conjugates. Functional properties such as emulsifying ability and emulsion stability, critical for food industry applications, improved in the conjugated samples. Particularly at 10% phenolic acid concentration, both emulsifying activity index (EAI) and emulsion stability index (ESI) significantly increased. This enhancement is likely due to surface modifications and increased surface charge of proteins, as indicated by elevated zeta potential. Higher zeta potential represents greater electrostatic repulsion between emulsion droplets, preventing aggregation and improving emulsion stability. Regarding antioxidant properties, DPPH radical scavenging assays demonstrated that all conjugated samples exhibited much higher antioxidant activity than pure protein. Increasing phenolic acid concentration led to higher free radical inhibition, indicating transfer of antioxidant properties from polyphenols to proteins upon conjugation. Overall, SPI-TA conjugates showed greater antioxidant activity compared to SPI-GA, attributed to tannic acid's structural features and higher number of phenolic groups. Color parameters (L^* , a^* , b^*) of samples changed after conjugation, with decreases in brightness (L^*), redness-greenness (a^*), and yellowness-blueness (b^*), reflecting darker coloration with a shift towards greenish and yellowish hues. These color changes are typically due to polyphenol oxidation and formation of new pigments in conjugate structures and should be carefully

considered in industrial applications. Statistical analyses identified SPI-GA 10% and SPI-TA 10% treatments as optimal conditions for enhancing the structural, functional, and antioxidant properties of soy protein isolate. These samples showed the highest conjugation degree, strongest antioxidant activity, and best emulsifying characteristics.

Conclusion: Based on the findings, covalent conjugation between soy protein isolate and phenolic acids, especially tannic acid, is an effective and economical method to improve the functional properties and stability of the protein.

These enhancements pave the way for broader applications of soy protein isolate in the food and pharmaceutical industries. Moreover, this study provides better insight into the mechanisms of protein-polyphenol interactions and the role of polyphenol concentration in controlling the final properties of conjugated products. Given their high antioxidant capacity, these conjugates have potential as natural and healthy additives in food formulations to enhance product stability and quality.

مقایسه اثر بر همکنش کنژوگه ایزوله پروتئین سویا با گالیک اسید و تانیک اسید بر ویژگی‌های ساختاری و

فعالیت آنتی اکسیدانی آن

سیما مهاجر خراسانی^۱، مهران اعلمی^۲✉، مرتضی خمیری^۲ و هدی شهیری طبرستانی^۲

^۱ دانشجوی دکتری علوم و مهندسی صنایع غذایی- فناوری مواد غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

^۲ مهران اعلمی، استاد دانشکده علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

^۳ مرتضی خمیری، استاد دانشکده علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

^۴ هدی شهیری طبرستانی، دانشیار دانشکده علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

✉ مسئول مکاتبه: mehranalami@gmail.com

چکیده

مشخصات مقاله

زمینه مطالعاتی: برهم‌کنش‌های کووالانسی میان پروتئین‌ها و اسیدهای فنولیک به عنوان یک روش مؤثر برای بهبود ویژگی‌های عملکردی پروتئین‌های گیاهی شناخته می‌شوند. این برهم‌کنش‌ها می‌توانند خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی پروتئین‌ها را بهبود بخشند و آنها را برای استفاده در صنایع مختلف مناسب‌تر سازند.

هدف: در پژوهش حاضر، برهم‌کنش بین ایزوله پروتئین سویا با گالیک اسید و تانیک اسید و تأثیر آن بر ویژگی‌های ساختاری و فعالیت آنتی‌اکسیدانی ایزوله پروتئین سویا مورد بررسی قرار گرفت. روش کار: به منظور بررسی این برهم‌کنش‌ها، گالیک اسید و تانیک اسید در غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ درصد (بر اساس وزن پروتئین) با ایزوله پروتئین سویا تحت شرایط قلیایی (pH=۹) واکنش داده و کنژوگه‌هایی تشکیل شد. کنژوگه‌های به دست آمده از طریق آزمون‌های اسپکتروفتومتری OPA، امولسیون‌کنندگی، ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، رنگ، الکتروفورز، پتانسیل زتا و طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR) مورد تحلیل و بررسی قرار گرفتند.

نتایج: با افزایش غلظت گالیک اسید و تانیک اسید تا ۱۰٪ درصد کنژوگه شدن به ترتیب از ۳۳/۲۸ درصد به ۴۵/۶۴ درصد و از ۵۲/۲۹ تا ۶۶/۵۵ افزایش یافت و سپس به حالت پایدار رسید. همچنین، مقادیر EAI و ESI در کنژوگه‌های SPI-TA (به ترتیب ۱۳/۶۵ و ۶۵/۳۲) بالاتر از SPI-GA (۱۵/۱۹ و ۷۳/۰۵) بود. علاوه بر این، افزایش درصد گالیک اسید و تانیک اسید تا ۱۰ درصد، موجب افزایش پتانسیل زتا به ترتیب به میزان ۲۶/۱۲- و ۲۷/۲- و کاهش معنی‌دار اندازه ذرات شد. شواهد الکتروفورز (SDS-PAGE) و FTIR نیز وجود پیوندهای کووالانسی میان پروتئین سویا با گالیک اسید و تانیک اسید را تأیید کردند.

نتیجه‌گیری نهایی: در میان تیمارهای مختلف SPI-GA 10% و SPI-TA 10% به عنوان تیمارهای بهینه انتخاب شد.

نوع مقاله:

علمی پژوهشی

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۱۴۰۴/۳/۳

پذیرش: ۱۴۰۴/۶/۲۲

انتشار: ۱۴۰۴/۶/۱۲

کلید واژه:

ایزوله پروتئین سویا، تانیک اسید، گالیک اسید، برهم‌کنش کنژوگه

مقدمه

در صنعت غذا، پروتئین‌ها نقش مهمی در سامانه‌های غذایی ایفا می‌کنند. از سوی دیگر، ناپایداری پروتئین‌ها در سامانه‌های غذایی، چالشی بزرگ برای صنعت غذا به شمار می‌رود و محققان را به سوی بهبود ویژگی‌های عملکردی پروتئین‌ها سوق داده است. ایزوله پروتئین سویا، به عنوان یک پروتئین گیاهی با ارزش غذایی بالا و جایگزینی بالقوه برای پروتئین‌های حیوانی به شمار می‌رود. با این حال، ناپایداری ایزوله پروتئین سویا در برابر حرارت، تغییرات pH و سایر فرآیندهای غذایی، استفاده از آن را در صنعت با چالش‌هایی مواجه کرده است (سوئی و همکاران، ۲۰۲۱). اخیراً، پژوهش‌ها نشان داده‌اند که اصلاح پروتئین‌ها از طریق ایجاد کنژوگه با پلی‌فنول‌ها می‌تواند ویژگی‌های عملکردی و اثرات سلامتی‌بخش آن‌ها را به طور قابل توجهی بهبود بخشد. پلی‌فنول‌ها به دلیل دارا بودن خواص آنتی‌اکسیدانی، ارتقاء سلامت و اثرات درمانی، به طور گسترده‌ای مورد مطالعه قرار می‌گیرند. ترکیبات فنولی متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که از ترکیبات گیاهی مشتق شده و به میزان زیادی در میوه‌ها، سبزیجات و دانه‌های غلات یافت می‌شوند. یکی از ترکیبات مهم در این گروه، اسیدهای فنولیک است. تانیک اسید (TA) و گالیک اسید (GA)، دو اسید فنولیک رایج، از نظر ساختاری به یکدیگر مرتبط هستند. تانیک اسید، که یک استر گالیک اسید و D-گلوکوز است، دارای گروه‌های فنولی متعدد و وزن مولکولی بالایی است، در حالی که وزن مولکولی گالیک اسید که تنها از یک حلقه فنولی تشکیل شده است، به طور قابل توجهی کمتر است (هانگر و همکاران، ۲۰۱۴). گالیک اسید و تانیک اسید هر دو دارای گروه‌های پیروگالول و کربوکسیل هستند که فعالیت‌های بیولوژیکی متعددی مانند توانایی‌های آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی و ضد سرطانی را برای آن‌ها فراهم می‌کند (هلنو و همکاران، ۲۰۱۵). گروه‌های هیدروکسیل موجود در گالیک اسید و تانیک اسید به راحتی به کینون تبدیل شده و ویژگی آنتی‌اکسیدانی خود را نشان می‌دهند (لیو و همکاران، ۲۰۱۹). تحقیقات نشان می‌دهد که گالیک اسید و تانیک اسید می‌توانند با مواد درشت مولکولی مانند پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها ترکیب شده و موجب پایداری پروتئین‌ها و

پلی‌فنول‌ها و بهبود ویژگی‌های آن‌ها برای افزایش کاربردها در طیف وسیعی از زمینه‌ها شوند. برهم‌کنش‌های بین پروتئین و پلی‌فنول شامل پیوندهای کووالانسی و غیرکووالانسی می‌باشند. در مقایسه با برهم‌کنش‌های غیرکووالانسی، برهم‌کنش‌های کووالانسی معمولاً برگشت‌ناپذیر بوده و نسبت به تغییرات شرایط محیطی مقاوم‌تر هستند (چوبینسکی و همکاران، ۲۰۱۷). روش‌های رایج برای برقراری پیوند کووالانسی (کنژوگاسیون) بین پروتئین و پلی‌فنول شامل روش‌های آنزیمی و غیرآنزیمی است. در مقایسه با روش‌های غیرآنزیمی، روش‌های آنزیمی سازگار با محیط زیست هستند اما پیچیده و گران قیمت می‌باشند. در بین روش‌های غیرآنزیمی، واکنش در محیط قلیایی رایج‌تر است. در این فرآیند، ابتدا پلی‌فنول به کینون تبدیل شده و سپس با پروتئین واکنش می‌دهد تا کنژوگه پروتئین-پلی‌فنول تشکیل شود (لیو و همکاران، ۲۰۱۹). مطالعات مختلفی در زمینه بهبود ویژگی‌های پروتئین از طریق ایجاد کنژوگه میان پروتئین‌ها و پلی‌فنول‌های مختلف انجام شده است. گیو و همکاران (۲۰۲۲) دریافتند که کنژوگه دوگانه ایزوله پروتئین سویا-تانیک اسید باعث بهبود پایداری حرارتی، ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و خصوصیات رئولوژیکی ژل در مقایسه با ایزوله پروتئین سویا می‌شود. همچنین، با افزایش میزان تانیک اسید، سختی و الاستیسیته ژل نیز افزایش می‌یابد. تانگزی و همکاران (۲۰۲۲) پیوند کنژوگه میان پروتئین آب پنیر و گالیک اسید، تانیک اسید و فرولیک اسید را بررسی کردند و نشان دادند که برهم‌کنش پروتئین آب پنیر با تانیک اسید، بیشترین میزان کنژوگاسیون، محتوی فنول و ویژگی آنتی‌اکسیدانی را در مقایسه با سایر پلی‌فنول‌ها دارد. همچنین، جیانگ و همکاران (۲۰۱۹) نشان دادند که برهم‌کنش کنژوگه فسفوتین با گالیک اسید موجب افزایش ویژگی آنتی‌اکسیدانی و فعالیت امولسیون‌کنندگی می‌شود. بنابراین، برهم‌کنش بین ایزوله پروتئین سویا و پلی‌فنول‌ها یکی از روش‌های مؤثر برای بهبود ویژگی‌های عملکردی پروتئین به شمار می‌رود. با توجه به اهمیت ارتقای ویژگی‌های عملکردی ایزوله پروتئین سویا به منظور گسترش کاربردهای صنعتی آن و نقش مؤثر پلی‌فنول‌ها در بهبود این

خلا به مدت ۲۴ ساعت خشک گردید (پی و همکاران، ۲۰۲۱). جهت سهولت تفسیر نتایج، تیمارها در جدول ۱ نام‌گذاری شدند.

Table 1- Abbreviations of treatment names

Sample codes	Gallic acid and Tannic acid proportions	
	Gallic acid (GA)	Tannic acid (TA)
SPI	0	0
SPI-GA 5%	5	0
SPI-GA 10%	10	0
SPI-GA 15%	15	0
SPI-TA 5%	0	5
SPI-TA 10%	0	10
SPI-TA 15%	0	15

تعیین درصد کنژوگه شدن

طبق روش گیو و همکاران (۲۰۲۱)، درصد کنژوگه شدن پروتئین با فنول‌ها با استفاده از روش فولین-سیوکالتیو محاسبه شد. بدین منظور، ابتدا ۲۰ میکرولیتر از نمونه با ۱/۱۶۰ میکرولیتر آب و ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین-سیوکالتیو ترکیب شد. سپس محلول مخلوط شد و به مدت ۶-۷ دقیقه در دمای محیط (در تاریکی) نگه داشته شد. پس از آن، ۳۰۰ میکرولیتر محلول کربنات سدیم ۲۰ درصد وزنی/وزنی به مخلوط اضافه گردید و مجدداً مخلوط شد. در نهایت، مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در بن‌ماری با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. غلظت فنول با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه شد. درصد کنژوگه شدن نمونه‌ها طبق فرمول زیر محاسبه گردید.

=درصد کنژوگه شدن

۱۰۰*(غلظت فنول قبل از دیالیز / غلظت فنول بعد از دیالیز) -

غلظت فنول قبل از دیالیز))

الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید (SDS-PAGE)

تشکیل پیوند کووالانسی بین پروتئین و پلی فنول، بر اساس آنالیز تغییرات وزن مولکولی پروتئین قبل و بعد از کنژوگه با استفاده از SDS-PAGE تایید شد. ژل آکریل آمید شامل ۱۰٪ ژل جداکننده، ۵٪ ژل انباشته و ۰/۱٪ SDS بود. نمونه‌ها به ترتیب با بافر نمونه (Tris-HCl ۰/۰۶۲۵ مولار، ۱۰٪

ویژگی‌ها، بررسی دقیق برهم‌کنش‌های کنژوگه میان این ترکیبات، ضرورتی اجتناب‌ناپذیر به نظر می‌رسد. از میان پلی‌فنول‌های مختلف، گالیک اسید و تانیک اسید به دلیل ساختار متفاوت و فعالیت‌های زیستی قابل‌توجه، گزینه‌های مناسبی برای مطالعه به‌شمار می‌روند. با وجود مطالعات پیشین، هنوز شناخت جامعی از تأثیر غلظت‌های مختلف این دو پلی‌فنول بر ویژگی‌های عملکردی، آنتی‌اکسیدانی و ساختاری ایزوله پروتئین سویا به‌دست نیامده است. بنابراین، پژوهش حاضر با هدف بررسی و مقایسه‌ی اثرات گالیک اسید و تانیک اسید در سطوح مختلف بر خواص کنژوگه ایزوله پروتئین سویا طراحی شده و می‌کوشد تا با تعیین شرایط بهینه، زمینه را برای استفاده گسترده‌تر از این کنژوگه‌ها در صنایع غذایی فراهم سازد.

مواد و روش‌ها

ایزوله پروتئین سویا (حاوی ۹۳ درصد پروتئین بر مبنای وزن خشک)، گالیک اسید و تانیک اسید و سایر مواد شیمیایی از شرکت سیگما تهیه شد.

تهیه کنژوگه‌های دو گانه SPI-GA و SPI-TA

ابتدا برای تهیه محلول پروتئین، ایزوله پروتئین سویا (غلظت ۲ درصد وزنی/حجمی) به مدت ۴ ساعت در دمای اتاق همزده شد و سپس با استفاده از محلول NaOH ۰/۱ مولار، pH محلول به ۹ تنظیم گردید. برای تهیه محلول‌های فنولی، محلول‌های جداگانه‌ای از تانیک اسید و گالیک اسید با غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ درصد بر حسب وزن پروتئین تهیه شدند. در مرحله بعد، محلول‌های فنولی با غلظت‌های مختلف به محلول پروتئینی به نسبت ۱:۱ مخلوط شدند. سپس، pH محلول‌های حاصل با استفاده از NaOH ۰/۱ مولار به ۹ تنظیم شد و محلول‌ها در دمای اتاق به مدت ۲۴ ساعت با استفاده از همزن مغناطیسی همزده شدند. به منظور حذف اسیدهای فنولی آزاد از محلول پروتئین، محلول‌های حاصل در کیسه دیالیز قرار گرفته و در محیط آب مقطر به مدت ۴۸ ساعت دیالیز شدند. در نهایت، محلول حاصل از دیالیز در فریزر منجمد شد و سپس در خشک‌کن انجمادی (در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد) تحت

که در آن A نشان دهنده جذب نمونه و محلول مخلوط اتانول DPPH، A_i نشان دهنده جذب نمونه و محلول اتانول ۹۵ درصد و A_j نشان دهنده جذب محلول اتانول DPPH است (گیامفی و همکاران ۱۹۹۹).

اندازه‌گیری ویژگی‌های امولسیون

برای تعیین ویژگی‌های امولسیون، شاخص پایداری امولسیون (EAI^۱) و شاخص فعالیت امولسیون (ESI^۲) اندازه‌گیری شدند. به این منظور، ابتدا ۶ میلی‌لیتر محلول نمونه (۱٪ وزنی/حجمی) و ۲ میلی‌لیتر روغن با استفاده از هم‌زنایزر با دور ۲۰۰۰ rpm و به مدت ۱ دقیقه مخلوط شدند. سپس امولسیون حاصل، در زمان‌های ۰ و ۱۰ دقیقه (پس از تهیه امولسیون) با محلول SDS (۱٪ درصد وزنی/حجمی) به میزان ۵۰ برابر رقیق گردید و جذب آن در طول موج ۵۰۰ نانومتر خوانده اندازه‌گیری شد. در نهایت، شاخص پایداری امولسیون و شاخص فعالیت امولسیون توسط فرمول‌های زیر محاسبه گردید (شا و همکاران ۲۰۲۱).

$$EAI (m2/g) = (2 * 2.303 A) DF / I\Phi C$$

$$ESI (min) = A0 * Dt / DA$$

A = جذب در ۵۰۰ نانومتر، DF = فاکتور رقیق سازی، L = طول مسیر، Φ = کسر حجمی روغن در امولسیون (۰/۲۵)، C = غلظت پروتئین در محلول مورد استفاده برای تهیه امولسیون، $\Delta t = 10 \text{ min}$ ، $\Delta A = A_0 - A_{10}$

پتانسیل زتا و اندازه قطرات

به منظور بررسی پایداری امولسیون، پتانسیل زتا و اندازه ذرات اندازه‌گیری شد. به این منظور ابتدا نمونه‌ها به طور کامل در یک بافر فسفات در pH=7.4 در غلظت ۱٪ حل شده و تا سطح مناسب رقیق شد و توزیع اندازه قطرات در امولسیون توسط دستگاه تفرق نور پویا Nanotracer Wave II (DLS) (Microtrac, Germany) و نیز پتانسیل زتا توسط دستگاه WALLIS (Cordouan Technology, France) در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد اندازه‌گیری شد (Zhao et al., 2019).

رنگ

گلیسرین، ۱۰٪ SDS، ۵٪ ۲-mercaptoethanol و ۰/۰۰۲۵٪ برموفنول آبی) مخلوط شدند، سپس نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در حمام آب جوش در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد و بعد از آن تا دمای اتاق خنک شدند. در مرحله بعد، ۲۰ میکرولیتر از نمونه‌ها در ژل بارگذاری شد و با ولتاژ ۸۰ میلی‌ولت در ژل انباشته‌کننده و سپس با ولتاژ ۱۲۰ ولت در ژل جداکننده بطور پیوسته الکتروفورز شدند تا زمانی که رنگ‌های ردیاب به انتهای ژل برسند. در نهایت ورقه‌های ژل با استفاده از سیستم تصویربرداری اسکن شدند. برای تخمین وزن مولکولی تمام نمونه‌ها از استانداردهای پروتئینی استفاده شد (لاملی، ۱۹۷۰).

طیف سنجی فروسرخ تبدیل فوریه (FTIR)

به منظور بررسی دقیق‌تر برهمکنش‌ها و تخمین تغییر ساختاری پروتئین‌ها پس از ایجاد کنژوگه (از طریق بررسی فرکانس پیوندهای آمیدی)، نمونه‌های خشک شده با خشک‌کن انجمادی با استفاده از اسپکتروفتومتر FTIR مورد آزمون قرار گرفتند. برای تهیه نمونه‌ها، از روش KBr-disk استفاده شد و برای تهیه قرص‌های جامد ۱ میلی‌گرم از نمونه (پودر حاصل از خشک‌کن انجمادی) با ۱۰۰ میلی‌گرم پتاسیم برمید ترکیب گردید. نمونه‌ها در محدوده طیفی 4000 cm^{-1} - 400 cm^{-1} با قدرت تفکیک 4 cm^{-1} آنالیز شدند (ونگ و همکاران ۲۰۲۰).

اندازه‌گیری ویژگی آنتی اکسیدانی

به این منظور ابتدا ۱ میلی‌گرم از نمونه‌های کنژوگه به ۴ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ مولار DPPH-اتانول اضافه شد و در فضای تاریک به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق واکنش داده شد. سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از میکروپلیت ریدر مدل BOECO BMR-100 Microplate Reader - BMR-100 اندازه‌گیری گردید. نرخ مهار رادیکال آزاد محاسبه‌شده DPPH طبق رابطه زیر محاسبه شد.

$$DPPH \text{ free radical scavenging rate (\%)} = 1 - (A - A_i) / A_j \times 100$$

² Emulsion Stability Index

¹ Emulsion Activity Index

جهت ارزیابی رنگ محصول، از دستگاه رنگ سنج (ColorFlex EZ Spectrophotometer / Colorimeter) (HunterLab America) استفاده شد و آنالیز رنگ به صورت سه شاخص L^* ، a^* و b^* انجام شد.

آنالیزهای آماری

در این مطالعه کلیه آزمون‌ها در سه تکرار انجام گرفت. داده‌های حاصل از آزمایش‌ها، با استفاده از طرح کاملاً تصادفی در قالب فاکتوریل تجزیه و تحلیل شدند. آنالیز واریانس و مقایسه تیمارها با استفاده از نرم افزار SAS انجام گرفت. مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت.

نتایج و بحث

درصد کنژوگه شدن

درصد کنژوگه شدن نشان دهنده میزان پیوند کووالانسی است. پیوند کووالانسی بین گروه‌های آمین آزاد پروتئین‌ها و هیدروکسیل پلی‌فنول‌ها رخ می‌دهد. بنابراین، اتصال بین یک پروتئین و یک پلی‌فنول می‌تواند منجر به کاهش گروه‌های آمین آزاد در پروتئین‌ها و افزایش درصد کنژوگه شدن شود. درصد کنژوگه شدن ایزوله پروتئین سویا با گالیک اسید و تانیک اسید در جدول ۲ نشان داده شده است. درصد کنژوگه شدن ایزوله پروتئین سویا-گالیک اسید با افزایش مقدار گالیک اسید تا ۱۰ درصد از ۳۳/۲۸ درصد تا ۴۵/۶۴ درصد بطور معنی داری افزایش یافت ($P < 0.05$) و بعد از آن ثابت شد. در کنژوگه‌های ایزوله پروتئین سویا-تانیک اسید نیز با افزایش مقدار تانیک اسید تا ۱۰ درصد، میزان کنژوگه شدن از ۵۲/۲۹ تا ۶۶/۵۵ افزایش و بعد از آن ثابت شد. با توجه به نتایج به دست آمده، میزان کنژوگه شدن ایزوله پروتئین سویا با تانیک اسید بیشتر از ایزوله پروتئین سویا با گالیک اسید است. این تفاوت می‌تواند به دلیل وزن مولکولی بالاتر تانیک اسید و تعداد بیشتر حلقه‌های فنولی در آن باشد که تحت شرایط قلیایی اکسید شده و به کینون تبدیل می‌شود و در نتیجه پیوندهای کووالانسی بیشتری با پروتئین تشکیل می‌دهد. در مطالعات متعددی پیوندهای کووالانسی بین ایزوله پروتئین سویا و پلی‌فنول‌های مختلف از

جمله گالیک اسید، تانیک اسید، کلروژنیک اسید، و اپی‌گالاکتوکاتچین گالات بررسی شده است (لو و همکاران، ۲۰۲۲؛ گیو و همکاران، ۲۰۲۱؛ یی و همکاران، ۲۰۲۱؛ یان و همکاران، ۲۰۲۳). گیو و همکاران (۲۰۲۱) نشان دادند که زمانی که ایزوله پروتئین سویا و تانیک اسید تحت شرایط قلیایی قرار می‌گیرند، مقدار اسید آمینه تریپتوفان کاهش می‌یابد، که این کاهش نشان‌دهنده پیوند کووالانسی بین ایزوله پروتئین سویا و تانیک اسید است. یی و همکاران (۲۰۲۱) دلیل درصد بالاتر کنژوگه شدن ایزوله پروتئین سویا با آنتوسیانین نسبت به گالیک اسید را وزن مولکولی بیشتر آنتوسیانین دانستند.

Table 2- Conjugation degree of SPI control and SPI-GA and SPI-TA conjugates

sample	Conjugation rate (%)
SPI	0.1±0.02 ^e
SPI-GA 5%	39.22±0.65 ^d
SPI-GA 10%	43.77±0.99 ^c
SPI-GA 15%	42.86±0.78 ^c
SPI-GA 20%	43.01±0.86 ^c
SPI-TA 5%	46.69±0.87 ^b
SPI-TA 10%	49.91±0.74 ^a
SPI-TA 15%	48.11±0.98 ^a
SPI-TA 20%	49.12±0.95 ^a

Mean values ± SD. Means with different superscripts in columns indicate significant differences among treatments ($P < 0.05$).

ویژگی آنتی اکسیدانی

تمام ترکیبات کنژوگه ایزوله پروتئین سویا-پلی فنول به دلیل ویژگی آنتی اکسیدانی پلی فنول‌ها، فعالیت مهار رادیکال بسیار بالاتری نسبت به ایزوله پروتئین سویا نشان دادند. با افزایش غلظت گالیک اسید و تانیک اسید، درصد مهار رادیکال آزاد DPPH افزایش یافت که نشان‌دهنده ظرفیت آنتی اکسیدانی گالیک اسید و تانیک اسید است. درصد آنتی اکسیدانی ایزوله پروتئین سویا برابر با ۱۷/۸۶٪ بود که با افزایش درصد گالیک اسید، ویژگی آنتی اکسیدانی از ۲۱/۷۷٪ به ۶۴/۰۲٪ و با افزایش درصد تانیک اسید از ۴۹/۶۶٪ به ۸۰/۳۱٪ بطور معنی داری افزایش یافت ($P < 0.05$) (جدول ۳). درصد آنتی اکسیدانی کنژوگه ایزوله پروتئین سویا-تانیک اسید بیشتر از ایزوله

پروتئین سویا-گالیک اسید است که نشان‌دهنده ویژگی آنتی‌اکسیدانی بالاتر تانیک اسید است. توانایی مهار رادیکال بالاتر تانیک اسید می‌تواند به دلیل تعداد بیشتر گروه‌های هیدروکسیل در مقایسه با گالیک اسید باشد که تنها سه گروه هیدروکسیل در موقعیت ارتو به حلقه آروماتیک پیوند دارند (آیودله و همکاران، ۲۰۱۵). رایس-ایوانز و همکاران (۱۹۹۶) گزارش کردند که موقعیت و تعداد گروه‌های هیدروکسیل در ترکیبات فنولی بر خواص آنتی‌اکسیدانی آنها تأثیر می‌گذارد.

Table 3- DPPH radical scavenging activity of SPI control, SPI-GA and SPI-TA conjugates

Sample	DPPH radical scavenging activity (%)
SPI	19.86±0.52 ^g
SPI-GA 5%	54.37±0.35 ^f
SPI-GA 10%	59.58±0.85 ^e
SPI-GA 15%	64.02±0.45 ^d
SPI-TA 5%	66.49±0.36 ^c
SPI-TA 10%	75.62±0.58 ^b
SPI-TA 15%	80.31±0.69 ^a

Mean values ± SD. Means with different superscripts in columns indicate significant differences among treatments ($P < 0.05$).

امولسیون‌کنندگی

پروتئین‌ها عامل اصلی امولسیون‌کننده در بسیاری از غذاها هستند. شاخص پایداری امولسیون (ESI) و شاخص فعالیت امولسیون‌کنندگی (EAI) پارامترهای مهمی هستند که عموماً برای بررسی خواص امولسیون‌کنندگی پروتئین‌ها در سامانه‌های امولسیون غذایی استفاده می‌شوند. EAI پوشش سطح نسبی یک پروتئین را بر روی یک قطره روغن در یک امولسیون رقیق تخمین می‌زند، در حالی که ESI ثبات نسبی آن را پس از یک زمان از پیش تعیین شده تخمین می‌زند (کوان و همکاران ۲۰۱۹). ترکیب پروتئین‌ها با پلی‌فنول‌ها به عنوان یک رویکرد موثر برای اصلاح یا افزایش عملکرد پروتئین‌ها شناخته شده است. توسعه کنژوگه‌های پروتئین-پلی‌فنول به عنوان امولسیفایرهای جدید نیز در سال‌های اخیر توجه زیادی را به خود جلب کرده است. افزودن پلی‌فنول‌ها (گالیک اسید و تانیک اسید) به ایزوله پروتئین سویا و تشکیل کنژوگه موجب افزایش

EAI و ESI شد (شکل ۱). با افزایش مقدار گالیک اسید و تانیک اسید تا ۱۰ درصد، میزان EAI و ESI بطور معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0.05$) و بعد از ثابت شد. میزان افزایش EAI و ESI در کنژوگه‌های ایزوله پروتئین سویا-تانیک اسید (به ترتیب ۱۳/۶۵ و ۶۵/۳۲) بیشتر از کنژوگه‌های ایزوله پروتئین سویا-گالیک اسید (۱۵/۱۹ و ۷۳/۰۵) می‌باشد که به دلیل تعداد بیشتر حلقه‌های فنولی در تانیک اسید می‌باشد که تحت شرایط قلیایی اکسید و به کینون تبدیل شده و با پروتئین پیوندهای کووالانسی بیشتری تشکیل می‌دهد. اتصال کووالانسی بخش‌های پلی‌فنول می‌تواند ساختار پروتئین را تغییر دهد و آب‌گریزی سطح آنها را افزایش دهد، بنابراین کشش سطحی را کاهش می‌دهد (چوبینسکی و دوئیکی ۲۰۱۷؛ گو و همکاران ۲۰۱۷).

تا کنون در مطالعات زیادی ویژگی امولسیون‌کنندگی کنژوگه‌های پروتئین-فنول به اثبات رسیده است. Liu و همکاران (۲۰۱۵) کنژوگه لاکتوفرین با پلی‌فنول‌های مختلف (EGCG، اسید کلروژنیک و گالیک اسید) را با استفاده از روش پیوند رادیکال آزاد سنتز کردند که خواص امولسیون‌کنندگی بهتری نسبت به لاکتوفرین اصلاح نشده داشتند. با این حال، کنژوگه لاکتوفرین-کلروژنیک اسید خواص امولسیون‌کنندگی بالاتری نسبت به کنژوگه‌های لاکتوفرین-EGCG و لاکتوفرین-گالیک اسید نشان داد (لیو و همکاران ۲۰۱۵). آیوسیری و همکاران (۲۰۱۳) همچنین دریافتند که ترکیب تانیک اسید اکسید شده در شرایط قلیایی می‌تواند به طور قابل توجهی خواص امولسیون‌کنندگی ژلاتین پوست ماهی را بهبود بخشد. عبدالمکسود و همکاران (۲۰۱۸) با استفاده از روش قلیایی، پیوند کووالانسی بین بتا لاکتوگلوبولین و کافئیک اسید بررسی کردند و دریافتند کنژوگه‌های به دست آمده خواص امولسیون‌کنندگی بهتری نسبت به بتا لاکتوگلوبولین نشان دادند.

موجب باز شدن ساختار پروتئین و در معرض قرار گرفتن اسید آمینه‌های با بار منفی از داخل به سطح پروتئین می‌شود. علاوه بر این کاهش اندازه ذرات ناشی از کنژوگه شدن ممکن است تعداد گروه‌های قابل یونیزاسیون را در سطح پروتئین افزایش دهد (لیو و همکاران ۲۰۲۳). پتانسیل زتا کنژوگه‌های تانیک اسید در مقایسه با کنژوگه‌های گالیک اسید بیشتر بود که به دلیل درصد بالاتر کنژوگه شدن (تشکیل تعداد بیشتر پیوندهای کووالانسی) تانیک اسید با ایزوله پروتئین سویا، تغییر بیشتر ساختار پروتئین و در نتیجه افزایش آب‌گریزی سطح و کاهش کشش سطحی می‌باشد (کوان و همکاران ۲۰۱۹). یی و همکاران (۲۰۲۱) نشان دادند با افزایش درصد گالیک اسید در کنژوگه ایزوله پروتئین سویا- گالیک اسید، پتانسیل زتا افزایش و اندازه ذرات کاهش یافت. همانطور که در جدول ۲ نشان داده شده است، اندازه ذرات ایزوله پروتئین سویا بزرگتر از کنژوگه‌ها بوده که تمایل به تجمع با یکدیگر دارند و امولسیون حاصل از آن دارای پایداری بسیار کمی است. با تشکیل کنژوگه، اندازه ذرات کوچکتر، مقدار پتانسیل زتا بالاتر و پایداری امولسیون افزایش یافته است. کوچکترین اندازه ذرات، بالاترین میزان زتا را دارا می‌باشد و در نتیجه بیشترین پایداری امولسیون مربوط به کنژوگه‌های SG 10% و ST 10% می‌باشد.

Table 4- Particle size and zeta potential of SPI control, SPI-GA and SPI-TA conjugates

Sample	Particle size (nm)	Zeta potential (mv)
SPI	907±35 ^a	-21.01±0.38 ^e
SPI-GA 5%	850.2±25 ^b	-23.1±0.26 ^d
SPI-GA 10%	735±41 ^c	-26.12±0.54 ^b
SPI-GA 15%	719.87±52 ^c	-26.5±0.7 ^b
SPI-TA 5%	695±36 ^c	-24.85±0.65 ^c
SPI-TA 10%	530.09±25 ^d	-27.82±0.25 ^a
SPI-TA 15%	520.02±45 ^d	-27.38±0.33 ^a

Mean values ± SD. Means with different superscripts in columns indicate significant differences among treatments (P<0.05).

الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید (SDS-PAGE)

آزمون الکتروفورز به منظور تخمین وزن مولکولی زیر واحد(ها) پروتئین و کنژوگه‌های مختلف انجام شد. الکتروفورز

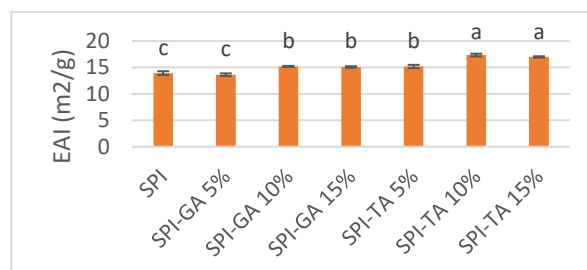


Figure 1- Emulsion activity index (EAI) of SPI control, SPI-GA and SPI-TA conjugates

Mean values ± SD. Means with different superscripts in columns indicate significant differences among treatments (P<0.05).

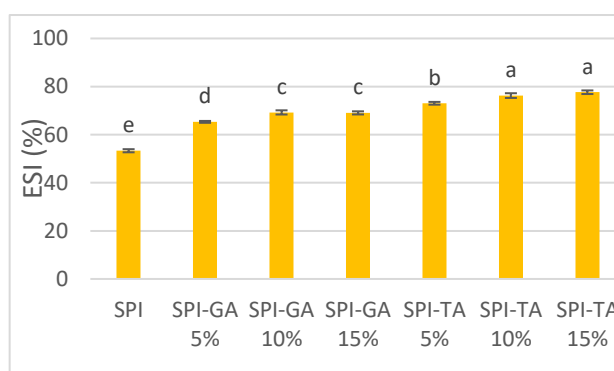


Figure 2- Emulsion stability index (ESI) of SPI control, SPI-GA and SPI-TA conjugates

Mean values ± SD. Means with different superscripts in columns indicate significant differences among treatments P<0.05).

پتانسیل زتا و اندازه ذرات

پتانسیل زتا و اندازه ذرات دو آزمون مهم برای تعیین پایداری امولسیون‌ها هستند، بطوریکه با کاهش اندازه ذرات، پتانسیل زتا افزایش و پایداری امولسیون نیز افزایش می‌یابد. با افزایش درصد گالیک اسید و تانیک اسید تا ۱۰ درصد، پتانسیل زتا (۲۶/۱۲- و ۲۷/۲-) در مقایسه با ایزوله پروتئین سویا (۲۱/۰۱-) بطور معنی‌داری افزایش و اندازه ذرات بطور معنی‌داری کاهش یافت (P<0.05) (جدول ۴). بیشترین اندازه ذرات مربوط به ایزوله پروتئین سویا (۹۰۷ نانومتر) و کمترین اندازه ذرات تیمارهای حاوی گالیک اسید و تانیک اسید به ترتیب مربوط به تیمارهای SPI-GA 10% (۷۳۵ نانومتر) و SPI-TA 10% (۵۲۰ نانومتر) است. ایجاد کنژوگه ایزوله پروتئین سویا با گالیک اسید و تانیک اسید تحت شرایط قلیایی بود که موجب افزایش بار منفی بر روی پروتئین شد. ایجاد کنژوگه

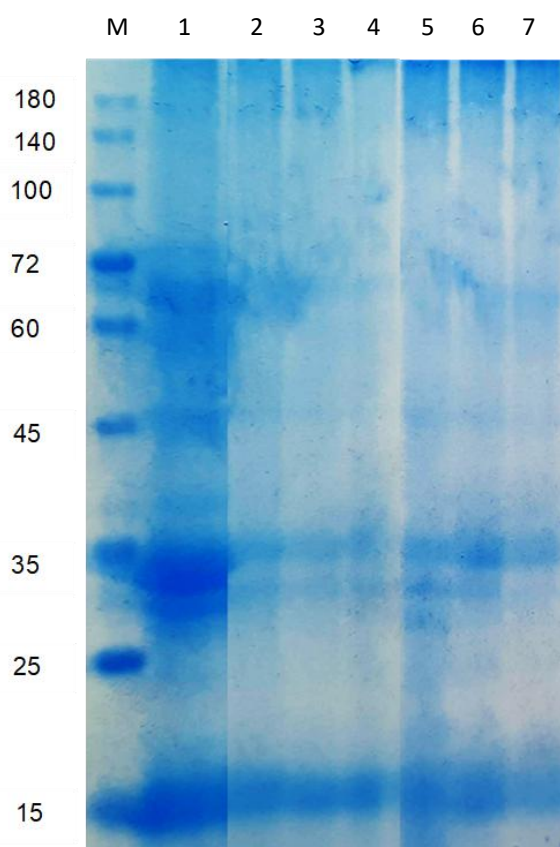


Figure 5- SDS-PAGE patterns of SPI control, SPI-GA and SPI-TA conjugates

M, marker protein; line 1, SPI; line 2-4, SPI-GA conjugates containing 5,10,15% GA; line 5-7, SPI-TA conjugates containing 5,10,15% TA

یک روش مناسب برای تایید پیوند کووالانسی بین پروتئین و گالیک اسید و تانیک اسید می‌باشد. باندهای اصلی ایزوله پروتئین سویا در ۷۲، ۳۵ و ۱۵ کیلو دالتون توزیع شده است که به دلیل اجزای مختلف پروتئین می‌باشد. در مقایسه با ایزوله پروتئین سویا، موقعیت باندهای اصلی کنژوگه‌های SPI-GA و SPI-TA مقداری به سمت بالا حرکت کرده‌اند که نشان دهنده تشکیل پیوند کووالانسی بین پروتئین و گالیک اسید و تانیک اسید و در نتیجه افزایش وزن مولکولی پروتئین بعد از پیوند کووالانسی است (شکل ۵). همچنین، باندهای اصلی زیر واحد(ها) پروتئین به صورت باندهای ضعیف‌تری ظاهر شدند. همچنین در نواحی بالا و ورود نمونه به ژل، کشیدگی باند (streaking) دیده می‌شود که به دلیل ایجاد کنژوگه و در نتیجه سنگین شدن پروتئین می‌باشد. گزارشات قبلی نشان داده‌اند که وزن مولکولی زیر واحد(ها) پروتئین‌ها پس از پیوند متقاطع کووالانسی پروتئین‌ها با پلی فنول‌ها افزایش می‌یابد (لی و همکاران، ۲۰۲۱). شی و همکاران (۲۰۲۲) نیز گزارش کردند باندهای کنژوگه‌های ایزوله پروتئین سویا با کلروژنیک اسید در مقایسه با باندهای ایزوله پروتئین سویا مقداری به سمت بالا حرکت کرده‌اند که به دلیل ایجاد پیوند کووالانسی بین آن‌ها می‌باشد.

طیف سنجی فروسرخ تبدیل فوری (FTIR)

طیف سنجی FTIR اغلب برای توصیف واکنش بین پروتئین‌ها و پلی فنول‌ها به ویژه تغییرات در ساختار ثانویه پروتئین‌ها استفاده می‌شود. در شکل ۳ و ۴ نمودارهای طیف سنجی FTIR نمونه‌های مختلف (SPI، SG 5%، SG 10%، SG 15%، ST 5%، ST 10%، ST 15%) نشان داده شده است. طبق شکل، ایزوله پروتئین سویا دارای سه باند جذبی شامل Amide A بین ۳۰۰۰-۳۷۰۰ (نشان دهنده ارتعاش کششی -OH و -NH در حلقه بنزن)، Amide I (نشان دهنده ارتعاش کششی CO-)، باندهای هیدروژنی و COO- و Amide II (نشان دهنده ارتعاش کششی CN- و ارتعاش خمشی NH-) در طیف جذبی بین ۱۵۰۰ تا ۱۷۰۰ می‌باشد (جیان و همکاران ۲۰۱۹). باند جذبی مربوط به Amide A در برهمکنش ایزوله

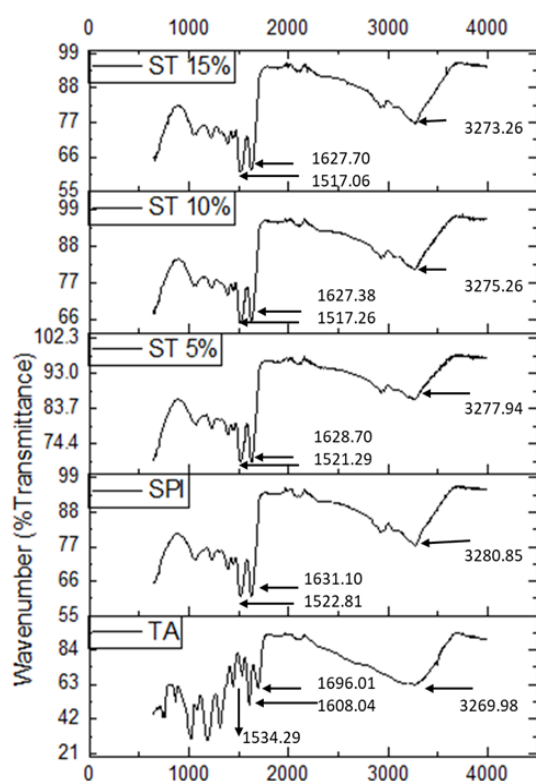


Figure 4- FTIR spectra of control SPI and SPI-TA conjugate

رنگ

تأثیر غلظت گالیک اسید و تانیک اسید بر رنگ در جدول ۵ نشان داده شده است. با افزایش غلظت گالیک اسید و تانیک اسید مقدار L^* ، a^* ، b^* بطور معنی‌داری کاهش یافت ($P < 0.05$) که به معنای افزایش تیرگی، سبزی و زردی می‌باشد. این تغییرات تفاوت رنگ در نتیجه واکنش پلی فنول-کینون با بقایای اسید آمینه می‌باشد. گیو و همکاران (۲۰۲۱) گزارش کردند با افزایش غلظت تانیک اسید در کنژوگه با پروتئین، مقدار L^* و a^* و b^* کاهش یافت.

پروتئین سویا و گالیک اسید در محدوده بین ۳۲۷۳/۴۰ تا ۳۲۸۰/۸۵ و در برهمکنش بین ایزوله پروتئین سویا و تانیک اسید در محدوده بین ۳۲۷۳/۲۶ تا ۳۲۸۰/۸۵ تغییر کرده است که می‌تواند در نتیجه برهمکنش باندهای هیدروژنی بین SPI و پلی فنول‌های گالیک اسید و تانیک اسید باشد. باندهای جذبی Amide I در برهمکنش ایزوله پروتئین سویا و گالیک اسید از ۱۶۳۱/۱۰ به ۱۵۲۴/۲۴ و در برهمکنش ایزوله پروتئین سویا و تانیک اسید در محدوده ۱۶۳۱/۱۰ به ۱۶۲۷/۳۸ بطور معنی‌داری کاهش داشته است ($P < 0.05$). همچنین باندهای جذبی در Amide II در برهمکنش ایزوله پروتئین سویا و گالیک اسید از ۱۵۲۲/۸۱ به ۱۵۱۶/۳۹ و در برهمکنش ایزوله پروتئین سویا و تانیک اسید از ۱۵۲۲/۸۱ به ۱۵۱۷/۰۶ کاهش یافت. این تغییرات با افزایش غلظت گالیک اسید و تانیک اسید نشان‌دهنده تغییرات در ساختار دوم پروتئین و واکنش بین SPI و GA است.

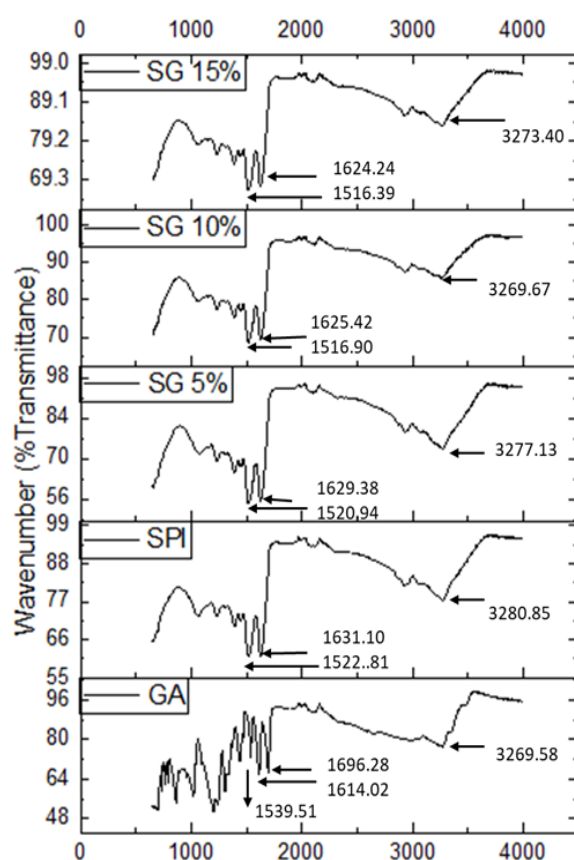


Figure 3- FTIR spectra of control SPI and SPI-GA conjugates

تانیک اسید، مقادیر L^* ، a^* و b^* کاهش یافت که این امر به معنای افزایش تیرگی، سبزی و زردی در نمونه‌ها است. بنابراین، در میان تیمارهای مختلف ۱۰٪ SPI-GA و ۱۰٪ SPI-TA به عنوان تیمارهای بهینه انتخاب شد.

Table 5- L^* , a^* and b^* of control SPI and SPI-TA conjugates

Sample	L^*	a^*	b^*
SPI	80.51±0.65 ^a	0.04±0.02 ^f	21.50±0.30 ^a
SPI-GA 5%	38.01±0.50 ^e	1.23±0.09 ^d	15.31±0.62 ^e
SPI-GA 10%	29.59±0.35 ^f	0.29±0.01 ^e	13.93±0.52 ^f
SPI-GA 15%	27.44±0.31 ^g	-0.75±0.12 ^g	9.74±0.12 ^g
SPI-TA 5%	46.60±0.45 ^b	4.44±0.06 ^a	20.89±0.43 ^b
SPI-TA 10%	40.16±0.11 ^c	3.72±0.11 ^b	18.35±0.58 ^d
SPI-TA 15%	39.10±0.35 ^d	3.27±0.10 ^c	19.60±0.21 ^c

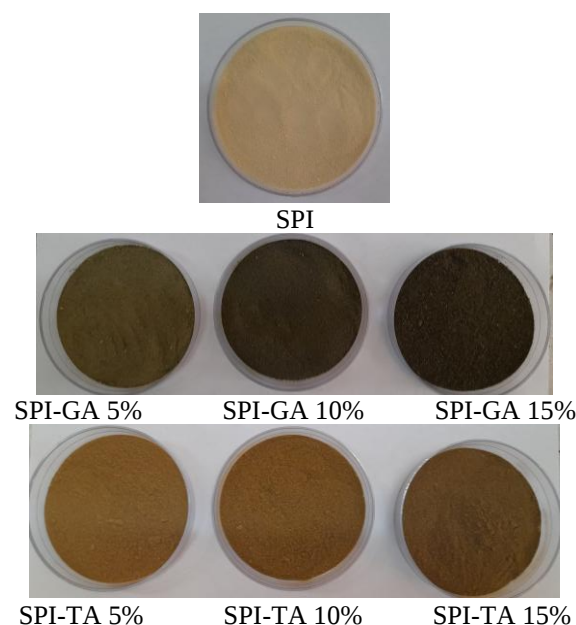


Figure 5- Image of control SPI and SPI-GA and SPI-TA conjugates

نتیجه گیری

نتایج نشان داد که با افزایش غلظت گالیک اسید و تانیک اسید تا ۱۰ درصد وزن پروتئین، درصد کنژوگه، پایداری امولسیون، توانایی امولسیون‌کنندگی و پتانسیل زتا افزایش یافت. این تغییرات برای کنژوگه‌های حاصل از تانیک اسید به‌طور معناداری بالاتر از کنژوگه‌های حاصل از گالیک اسید بود. همچنین، نتایج آزمون الکتروفورز نشان داد که باندهای اصلی کنژوگه‌های SPI-GA و SPI-TA نسبت به ایزوله پروتئین سویا به سمت بالا حرکت کرده‌اند که این تغییر موقعیت باندها نشان‌دهنده تشکیل پیوندهای کووالانسی بین پروتئین و گالیک اسید و تانیک اسید است. نتایج FTIR نیز تغییراتی در باندهای جذبی Amide A، Amide I و Amide II را نشان داد که این تغییرات دلیلی بر واکنش پروتئین با گالیک اسید و تانیک اسید می‌باشد. علاوه بر این، با افزایش غلظت گالیک اسید و

References

- Abd El-Maksoud, A. A., Abd El-Ghany, I. H., El-Beltagi, H. S., Anankanbil, S., Banerjee, C., Petersen, S. V., ... & Guo, Z. 2018. Adding functionality to milk-based protein: Preparation, and physico-chemical characterization of β -lactoglobulin-phenolic conjugates. *Food Chemistry*, 241: 281-289.
- Aewsiri, T., Benjakul, S., Visessanguan, W., Wierenga, P. A., & Gruppen, H. 2013. Emulsifying property and antioxidative activity of cuttlefish skin gelatin modified with oxidized linoleic acid and oxidized tannic acid. *Food and Bioprocess Technology*, 6: 870-881.
- Ayodele, J. A., Ayodeji, A. O., Oluwafemi, T. O., Sunday, A. O., & Scholarstical, A. 2015. Inhibitory effect of tannic acid and its derivative (gallic acid) against cisplatin-induced thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) production in rat kidney-in vitro. *International Journal of Advanced Research*, 3(1): 116-126.
- Czubinski, J., & Dwiecki, K. 2017. A review of methods used for investigation of protein-phenolic compound interactions. *International Journal of Food Science and Technology*, 52(3): 573-585.
- Gu, L., Su, Y., Zhang, M., Chang, C., Li, J., McClements, D. J., & Yang, Y. 2017. Protection of β -carotene from chemical degradation in emulsion-based delivery systems using antioxidant interfacial complexes: Catechin-egg white protein conjugates. *Food Research International*, 96: 84-93.
- Guo, Y., Bao, Y. H., Sun, K. F., Chang, C., & Liu, W. F. 2021. Effects of covalent interactions and gel characteristics on soy protein-tannic acid conjugates prepared under alkaline conditions. *Food Hydrocolloids*, 112: 106-293.
- Gyamfi, M. A., Yonamine, M., & Aniya, Y. 1999. Free-radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana: *Thonningia sanguinea* on experimentally-induced liver injuries. *General Pharmacology: The Vascular System*, 32(6): 661-667.
- Hager, A. S., Vallons, K. J., & Arendt, E. K. 2012. Influence of gallic acid and tannic acid on the mechanical and barrier properties of wheat gluten films. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(24): 6157-6163.
- Heleno, S. A., Martins, A., Queiroz, M. J. R., & Ferreira, I. C. 2015. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Food chemistry*, 173: 501-513.
- Jiang, B., Wang, X., Wang, L., Wu, S., Li, D., Liu, C., & Feng, Z. 2019. Study on the preparation and conjugation mechanism of the phosvitin-gallic acid complex with an antioxidant and emulsifying capability. *Polymers*, 11(9): 14-64.
- Jiang, L., Liu, Y., Li, L., Qi, B., Ju, M., Xu, Y., ... & Sui, X. 2019. Covalent conjugates of anthocyanins to soy protein: Unravelling their structure features and in vitro gastrointestinal digestion fate. *Food Research International*, 120: 603-609.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, London 227: 680-685.
- Li, X., Li, M., Zhang, T., McClements, D. J., Liu, X., Wu, X., & Liu, F. 2021. Enzymatic and nonenzymatic conjugates of lactoferrin and (-)-epigallocatechin gallate: Formation, structure, functionality, and allergenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(22): 6291-6302.
- Liu, F., Sun, C., Yang, W., Yuan, F., & Gao, Y. 2015. Structural characterization and functional evaluation of lactoferrin-polyphenol conjugates formed by free-radical graft copolymerization. *Rsc Advances*, 5(20): 15641-15651.
- Liu, J., Yong, H., Yao, X., Hu, H., Yun, D., & Xiao, L. 2019. Recent advances in phenolic-protein conjugates: Synthesis, characterization, biological activities and potential applications. *RSC advances*, 9(61): 35825-35840.
- Luo, X., Lu, J., Wu, Y., Duan, W., An, F., Huang, Q., ... & Wei, S. 2022. Reducing the potential allergenicity of amandin through binding to (-)-epigallocatechin gallate. *Food Chemistry: X*, 16, 100482.
- Quan, T. H., Benjakul, S., Sae-leaw, T., Balange, A. K., & Maqsood, S. 2019. Protein-polyphenol conjugates: Antioxidant property, functionalities and their applications. *Trends in Food Science & Technology*, 91: 507-517.

- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology and medicine*, 20(7): 933-956.
- Shi, J., Cui, Y. F., Zhou, G., Li, N., Sun, X., Wang, X., & Xu, N. 2022. Covalent interaction of soy protein isolate and chlorogenic acid: Effect on protein structure and functional properties. *LWT*, 170: 114081.
- Sha, L., Koosis, A. O., Wang, Q., True, A. D., & Xiong, Y. L. 2021. Interfacial dilatational and emulsifying properties of ultrasound-treated pea protein. *Food Chemistry*, 350: 129271.
- Sui, X., Zhang, T., & Jiang, L. 2021. Soy protein: Molecular structure revisited and recent advances in processing technologies. *Annual Review of Food Science and Technology*, 12(1): 119-147.
- Thongzai, H., Matan, N., Ganesan, P., & Aewsiri, T. 2022. Interfacial properties and antioxidant activity of whey protein-phenolic complexes: Effect of phenolic type and concentration. *Applied Sciences*, 12(6): 2916.
- Wang, H., Yan, Y., Feng, X., Wu, Z., Guo, Y., Li, H., & Zhu, Q. 2020. Improved physicochemical stability of emulsions enriched in lutein by a combination of chlorogenic acid–whey protein isolate–dextran and vitamin E. *Journal of Food Science*, 85(10): 3323-3332.
- Yan, S., Wang, Q., Yu, J., Li, Y., & Qi, B. 2023. Ultrasound-assisted preparation of protein–polyphenol conjugates and their structural and functional characteristics. *Ultrasonics Sonochemistry*, 100: 106645.