

Evaluation of the Effects of Heat Treatment, High-Shear Microparticulation, and Xanthan Gum on the Functional Properties of *Lathyrus sativus* Protein Isolate for Plant-Based Food Formulations

ABSTRACT

This study evaluated the techno-functional and structural properties of grass pea (*Lathyrus sativus*) protein isolate (GPI) across five distinct treatments: Grass Pea Isolate (GPI), heat-treated GPI (HGPI), HGPI with xanthan gum (HGPI+XG), microparticulated HGPI (HGPI+MPs), and a microparticle-xanthan gum complex (HGPI+MPs+XG). Alkaline extraction yielded a high-purity isolate (91.27%). Although thermal treatment induced protein denaturation leading to undesirable macro-aggregation, incorporating xanthan gum during high-shear microparticulation effectively prevented particle coalescence via protein-polysaccharide interactions, boosting microparticle yield to 92.03%. Structural modification and partial chain unfolding established an optimized 3D macromolecular network, reducing the least gelation concentration (LGC) to 8%. The HGPI+MPs+XG complex exhibited superior performance, with notable increases in pH-dependent solubility, emulsifying capacity, emulsion stability, water-holding capacity (WHC, 82.76% to 98.49%), and oil-holding capacity (OHC, +97.77%). Fluorescence microscopy, PDI_{LS} (0.07 μ m), Sutter number (5.91 μ m), and DPI (1.06 μ m) observations confirmed the formation of spherical, homogeneous, and stable microparticles. Disulfide bond analysis indicated that sulfhydryl groups were directly involved in driving this structural stability. Overall, these findings indicate that microparticulated grass pea protein complexes hold significant potential as texturizing and emulsifying agents for clean-label food formulations and potential application in plant-based matrices, pending further sensory evaluation, texture profile analysis (TPA), and real-food matrix stability studies.

Keywords: Grass Pea Protein Isolate, Microparticulation, Physicochemical properties, Xanthan Gum

EXTENDED ABSTRACT

Introduction

Developing plant-based meat and cheese analogues with appropriate textural properties remains a significant challenge in food engineering. While alternative proteins are increasingly sought to meet global nutritional demands, their native structures often lack the requisite techno-functional attributes to accurately replicate the sensory and structural complexity of animal-derived tissues. Grass pea (*Lathyrus sativus*) has emerged as a promising, cost-effective, and high-protein legume, particularly noted for its rich lysine content. Nevertheless, native legume proteins often exhibit poor solubility and a high propensity for thermal macro-aggregation, resulting in structural non-uniformity and unfavorable organoleptic profiles in final food formulations. To circumvent these limitations, microparticulation via high-shear processing (Ultra-Turrax at 10,000 rpm) serves as a strategic texturization approach. Carefully targeting particle size thresholds smaller than 10 μ m to optimize mouthfeel and structural. Although thermal processing facilitates the denaturation of globular proteins thereby exposing amphiphilic and hydrophobic domains to enhance water-holding capacity (WHC) the inherent thermodynamic driving force toward self-aggregation often restricts their individual application. Recent advancements have shifted toward the fabrication of protein-polysaccharide complexes to stabilize these microparticulated matrices. Xanthan gum (XG), an anionic heteropolysaccharide, acts as a potent hydrocolloid stabilizer due to its exceptional hydration capacity and rheology-modifying properties. When integrated under sequential thermal and high-shear regimes, XG mitigates the coalescence of denatured protein fragments by establishing a highly viscous continuous phase and potentially forming an interlocking, mosaic-like network with microparticulated proteins (MPs). While literature addresses microparticulation in common pulses like pea protein, systematic insights into the combinatorial interaction between grass pea protein isolate (GPI) and XG under coupled thermal-mechanical shear remain limited. Therefore, this study aims to evaluate five experimental treatments including Grass pea protein isolate (GPI), Heat-treated GPI (HGPI), thermally treated GPI and xanthan gum (HGPI+XG), microparticulated GPI (HGPI+MPs), and the combined complex (HGPI+MPs+XG) to elucidate their physicochemical, interfacial, and structural characteristics. This research provides a scalable engineering framework for developing high-performance texturizers suitable for advanced clean-label food systems. However, their performance in the formulation of meat and cheese analogs requires additional research, including texturometric tests (TPA), sensory evaluations, and stability studies in real food matrices.

Materials and Methods

Grass pea protein isolate (GPI) was extracted using alkaline solubilization at pH 9.7 (using 1 M NaOH) followed by isoelectric precipitation at pH 4.2 (using 1 M HCl). The precipitate was recovered by centrifugation (7600 $\times$ g, 30 min, 4 $^{\circ}$ C), neutralized, freeze-dried, and stored at -20 $^{\circ}$ C. A completely randomized design (CRD) was employed to evaluate five experimental treatments: (1) Grass pea protein isolate (GPI) (Control), (2) Heat-treated GPI (HGPI) (T; 80 $^{\circ}$ C for 30 min), (3) Combined HGPI and 3% (w/w) xanthan gum (HGPI+XG), (4) Combined HGPI and microparticulated (HGPI+MPs) (MP; Ultra-Turrax at 10,000 rpm for 5 min), and (5) Heat and microparticulated GPI with 3% (w/w) xanthan gum (HGPI+XG+MPs). The primary response variables

included microparticulate yield, protein solubility, water/oil holding capacities (WHC/OHC), emulsifying activity/stability indices (EACI/EASI), least gelation concentration (LGC), particle size, and Fluorescence microscopy, PDI_{DLS} , Sutter number and DPI. All experiments were performed in triplicate ($n=3$). Statistical significance was determined using one-way Analysis of Variance (ANOVA) followed by Duncan's multiple range test at a significance level of $P<0.05$ using SPSS software (Version 22).

Results and Discussion

Proximate Composition and Microparticulation Yield

The proximate composition of grass pea (*Lathyrus sativus*) flour and its resulting protein isolate (GPI) demonstrated that the alkaline extraction process serves as a highly efficient downstream separation technique. This extraction significantly reduced the crude fat, moisture, fiber, and ash fractions, thereby isolating a high-purity protein matrix with a concentration of 91.27%. This isolated protein served as the core macromolecular ingredient for all subsequent formulations.

During conventional thermal processing, the protein experienced widespread denaturation, which triggered irreversible macro-aggregation, leading to a highly non-uniform and coarse structural texture (HGPI). To mitigate this structural limitation, high-shear mechanical micronization was deployed. When thermal treatment was coupled with microparticulation alone (HGPI+MPs), 83.84% of the denatured protein aggregates were successfully converted into stable microparticles with a well-defined average size of 6 μm . Notably, the integration of xanthan gum during this thermal-mechanical processing (HGPI+XG+MPs) significantly elevated the microparticle yield to 92.03%. This increase confirms that xanthan gum effectively exerts a stabilizing, anti-aggregation effect, establishing an interlocking mosaic-like network that physically entraps the protein fragments and prevents their coalescence via electrostatic protein-polysaccharide complexation.

Techno-Functional Profiles: Solubility, Emulsification, and Hydration

The techno-functional attributes of the samples were strictly governed by pH and structural modifications. The thermodynamic solubility profiles of all samples remained highly pH-dependent, maintaining a typical U-shaped curve. While native GPI exhibited the lowest overall solubility across the investigated pH range, the completely modified complex (HGPI+XG+MPs) achieved a combined increase in solubility. This improvement is attributed to structural unfolding and high-shear homogenization, which disrupted the tight globular configuration of the grass pea protein.

Interfacial properties followed a similar trend. HGPI+XG+MPs demonstrated the highest emulsifying capacity and emulsion stability, followed by HGPI+MPs and HGPI+XG. This enhancement is driven by the structural exposure of previously buried hydrophilic and hydrophobic domains, which lowers the interfacial tension at the oil-water interface. Additionally, the high hydrophilicity of xanthan gum promotes robust hydrogen bonding within the continuous phase.

Hydration and oil absorption capacities were significantly altered by the engineering treatments. The combination of heat, shear, and hydrocolloids in HGPI+XG+MPs resulted in the highest water absorption capacity (3.00 g/g) and oil absorption capacity (2.73 g/g). This is mechanically explained by the controlled unfolding of the polypeptide chains, which facilitates capillary entrapment within the porous, laminated macromolecular architecture that mimics texturized animal tissues.

Foaming, Gelation, and Structural Characterization

Conversely, foaming properties were inversely affected by the modifications. Foaming capacity (FC) and foaming stability (FS) peaked sharply in the native GPI (HGPI+XG+MPs: 39.03% and 90.29%, respectively), whereas the microparticulated HGPI+XG complex (HGPI+XG+MPs) exhibited the minimum values (15.53% FC and 83.72% FS). The combination of intense thermal denaturation, mechanical shear, and the viscosity-enhancing effects of xanthan gum restricted the rapid diffusion, reorientation, and concentration of protein molecules at the gas-liquid interface. In industrial operations, this controlled reduction in foaming is highly beneficial as it prevents manufacturing defects caused by excessive aeration during mixing.

Furthermore, the macro-structural network formation was optimized. Microparticulation effectively reduced the least gelation concentration (LGC) from 12% in GPI to 8% in HGPI+MPs and HGPI+XG+MPs. Unlike cold-water solubility, LGC involves a thermal dissolution process where heat induces a cohesive three-dimensional viscoelastic gel network via protein-protein and protein-solvent interactions.

Direct structural observations were provided by fluorescence microscopy, PDI, Sutter number, and DPI which confirmed that GPI consisted of large, irregular aggregates. Thermal treatment alone (HGPI) decreased the particle size but caused extensive agglomeration, while HGPI+XG exhibited high size heterogeneity. High-shear homogenization in HGPI+MPs caused slight aggregate formation due to increased collision frequency under shear stress. However, HGPI+XG+MPs displayed a highly

homogenous, uniform, and spherical particle distribution (PDI_{DLS} (0.07 μm), Sutter number (5.91 μm), and DPI (1.06 μm)) , proving that xanthan gum successfully creates steric barriers against protein self-aggregation. DLS test determined a size of 6 μm for HGPI+XG+MPs. Analysis of sulfhydryl and disulfide bonds identified one of the factors for the stability. Total and free sulfhydryl contents showed a progressive increase from GPI to HGPI+XG+MPs, confirming that covalent disulfide (S-S) cross-linking is the primary driving force behind the structural stabilization and texturization of these high-performance, clean-label and plant-based matrices.

Conclusions

This study demonstrates that alkaline extraction can successfully produce a high-purity grass pea protein isolate (91.27%), serving it as a viable functional ingredient for food formulations. Although thermal treatments induce protein denaturation and undesirable macro-aggregation, the combination of high-shear microparticulation and xanthan gum effectively resolves this structural limitation. Following thermal treatment and micronization, microparticles with an average size of 6 μm were obtained. The integration of xanthan gum prevents microparticle agglomeration through electrostatic protein-polysaccharide complexation, significantly improving emulsion stability, solubility, water holding capacity (WHC), and oil holding capacity (OHC). Moreover, this combined modification reduced the least gelation concentration to 8%, promoting the formation of a stable three-dimensional macromolecular network. Microscopic observations and sulfhydryl analyses confirmed that the microparticulated complexes maintain a homogenous, spherical geometry stabilized by disulfide cross-linking. Consequently, microparticulated grass pea protein isolates exhibit excellent techno-functional properties, highlighting their potential application as texturizing ingredients in plant-based meat and cheese analogues. However, further studies including sensory evaluation, texture profile analysis (TPA) in real food matrices, shelf-life assessment, and regulatory considerations are required to fully evaluate their performance in commercial food formulations. The improved functional properties (such as emulsification, water-holding capacity, and rheological stability) observed in this study suggest that the investigated treatments have potential applications in various food matrices, including protein-based systems like dairy and meat analogs. However, further studies are required to optimize the specific textural attributes (e.g., fibrous structure in meat vs. micellar network in cheese) required for each application.

بهبود ویژگی‌های عملکردی ایزوله‌های پروتئین خلر از طریق اثرات ترکیبی حرارت‌دهی، ریزدانه سازی با نیروی برشی و صمغ زانتان برای استفاده در فرمولاسیون‌های غذایی گیاهی

چکیده

در این پژوهش، ویژگی‌های ساختاری و عملکردی ایزوله پروتئینی خلر (*Lathyrus sativus*) تحت فرآیندهای همزمان حرارتی، افزودن صمغ زانتان و ریزدانه‌سازی برشی ارزیابی شد. استخراج قلیایی منجر به دستیابی به ایزوله با خلوص ۹۱/۲۷ درصد گردید. اگرچه عملیات حرارتی سبب دناتوراسیون و آگلوتیناسیون ناخواسته شد، حضور صمغ زانتان طی ریزدانه‌سازی برشی از تجمع مجدد ذرات جلوگیری کرده و بازده تولید ریزذرات را به ۹۲/۰۳ درصد رساند. باز شدن زنجیره‌های پروتئینی و در معرض قرار گرفتن گروه‌های هیدروفوب و هیدروفیل، شبکه سه‌بعدی ماکرومولکولی را بهبود و کمترین غلظت تشکیل ژل (LGC) را به ۸٪ کاهش داد. کمپلکس پروتئین ریزدانه‌شده-صمغ زانتان بالاترین حلالیت وابسته به pH، ظرفیت امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون را نشان داد و ظرفیت نگهداری آب (WHC) از ۸۲/۷۶ به ۹۸/۴۹٪ و روغن (OHC) با ۹۷/۷۷٪ افزایش را به شکل چشمگیری بهبود بخشید.

تصاویر میکروسکوپ فلورسانس، عدد ساتر (۵/۹۱ μm)، DPI (۱/۰۶ μm) و PDI (۰/۰۷ μm) تشکیل ریزذرات کروی، همگن و پایدار را تأیید کردند و آزمون DLS اندازه ریزذرات را ۶ μm نشان داد. همچنین ارزیابی پیوندهای دی‌سولفیدی، نقش گروه‌های سولفیدریل را در تثبیت ساختاری تأیید نمود. در مجموع، این کمپلکس‌ها پتانسیل بالایی به عنوان هیدروکلوئید، عامل بافت‌دهنده و امولسیون‌کننده در فرمولاسیون‌های برچسب پاک (Clean-label) دارند؛ اگرچه به‌کارگیری آن‌ها در آنالوگ‌های گوشت و پنیر مستلزم ارزیابی‌های حسی، بافت‌سنجی (TPA) و بررسی پایداری در ماتریس واقعی غذا است.

مقدمه

استفاده از ریزذرات پروتئین و صمغ زانتان جهت ایجاد بافت در آنالوگ‌های گیاهی روشی نوظهور است. این ترکیبات با کمک حرارت به صورت ریزذره پروتئین- پلی ساکارید ایجاد می‌گردد (Liu et al., 2025). در میان تمام پلیمرهای زیستی، پروتئین‌ها بهترین گزینه جهت ساخت ریزذرات هستند. زیرا آنها علاوه بر توانایی تشکیل ریزذره، دارای ساختار مولکولی آمفی‌فیلیک هستند که آنها را قادر می‌سازد تا پیوندهای آبگریز ایجاد کنند (Wu et al., 2025). همچنین از پروتئین حیوانی مانند آب پنیر پایدارتر هستند (Fasolin et al., 2019). با توجه به تقاضای روزافزون پروتئین برای پاسخگویی به جمعیت رو به رشد جهان، وجود منابع پروتئینی جدید ارزان قیمت و غنی از پروتئین بسیار ضروری است (Hussien et al., 2020). خلر با نام علمی *Lathyrus sativus* از خانواده حبوبات با پروتئین بالا و غنی از اسیدآمینه ضروری لیزین به‌عنوان منبع پروتئین باکیفیت و ارزان در تولید غذاهای نوآورانه قابل استفاده است (Boukid et al., 2020; Mehr & Koocheki, 2021). با وجود ارزش تغذیه‌ای بالای خلر، حضور ترکیبات ضدتغذیه‌ای به‌ویژه نوروتوکسین^۱ (β-ODAP) از چالش‌های مصرف مستقیم آن است. با این حال، مطالعات نشان داده‌اند که فرآیند استخراج قلیایی pH ۸-۱۰ و رسوبدهی ایزوالکتریک به دلیل محلول بودن این سموم در فاز آبی، منجر به خروج و کاهش چشمگیر میزان ODAP در ایزوله پروتئینی نهایی می‌گردد (Ahmad & Nain, 2020). علاوه بر مقدار پروتئین، استفاده از مهندسی سیستم‌های مبتنی بر ریزذرات تأثیر مستقیم بر روی بهبود بافت دارد (Alehosseini et al., 2025; Monroy-Rodríguez et al., 2021). خلر پتانسیل بالایی برای تولید ریزذره دارد. خواص فیزیکوشیمیایی و عملکردی ریزذرات به اندازه آنها بستگی دارد که می‌تواند باعث تغییر عملکرد در غذا و حتی داخل دستگاه گوارش شود (Matalanis et al., 2012). اندازه کوچکتر از ۱۰ میکرومتر (بین ۲-۱۰ میکرومتر، حد آستانه حس زبری (Grittiness) در دهان) به عنوان سطح هدف مناسب شناسایی شد (Leon et al., 2016). ریزذره با این اندازه به‌عنوان اصلاح کننده بافت در مایعات و مواد پوره‌ای استفاده می‌شود. برای تولید ریزذرات با اندازه میکرومتر از نیروی برشی مانند اولتراسونیکس استفاده می‌شود تا خواص عملکردی مناسب برای طراحی و تولید محصولات با کیفیت بهبود یافته ایجاد گردد (Leon et al., 2016). پروتئین‌های ریزذره شده و صمغ زانتان می‌توانند به صورت ترکیبی سبب اصلاح بافت شوند. صمغ زانتان (XG) یک هتروپلی ساکارید آنیونی خارج سلولی تولید شده توسط *Xanthomonas campestris* است که با پایداری بالا و ویژگی آبدوستی و توانایی جذب آب بالا به‌عنوان عامل ژل‌کننده و تثبیت‌کننده در تولید ژل مورد استفاده قرار می‌گیرد (Bascuas et al., 2021). این فرایند با استفاده از گرما و نیروی برشی به صورت همزمان یا متوالی برای جلوگیری از تجمع و رشد ریزذرات انجام می‌شود (Amagliani et al., 2020; Zhang et al., 2020). عملیات حرارتی باعث دناتوراسیون غیر قابل برگشت، افزایش ظرفیت نگهداری آب و پایداری آمولسیون می‌شود ولی در عین حال باعث تجمع ذرات نیز می‌گردد (Qi et al., 2020). پس از عملیات حرارتی می‌توان از واکنش فیزیکی (سرد کردن) برای اتصال متقابل پروتئین‌ها و تثبیت ساختار ذرات استفاده کرد (Tanger et al., 2021). خواص فیزیکوشیمیایی محصولات غذایی به شدت تحت تأثیر ویژگی‌ها و مقدار پروتئین، صمغ زانتان، اندازه ذرات، همچنین دما و مدت زمان حرارت‌دهی، سرد کردن و در آخر برهم‌کنش‌ها و تعاملات بین ترکیبات است. بنابراین بهبود بافت با استفاده از مواد مناسب و مهندسی آن یعنی ساخت ریزذره مبتنی بر پلیمرهای زیستی با پراکندگی رضایت‌بخش به موضوع مهمی تبدیل شده است. که باید برای ترویج و صنعتی‌سازی آن برای کاربردهای غذایی مورد توجه قرار گیرد.

¹ Microparticles

^۲Xanthan Gum

^۳β-N-oxalyl-L-α,β-diaminopropionic acid

پیشینه پژوهش

Tanger et al. (۲۰۲۱) در تحقیق خود از پروتئین نخود برای تولید ریزذرات استفاده کردند. این روش سبب کاهش تجمع ذرات شد و نشان داد ریزذرات پروتئین نخود عمدتاً توسط فعل و انفعالات آبریز تثبیت شدند. مطالعه ای نیز توسط Wu et al. (۲۰۲۵)، بر روی ترکیب صمغ زانتان و نانوذرات زئین برای بهبود امولسیون کنندگی انجام گرفت. نتایج، تورم مولکول های صمغ زانتان در فاز پیوسته آبی یک شبکه مولکولی پایدار و بسیار چسبناک که مانع حرکت مواد در امولسیون می شود را نشان داد. بنابراین باعث جاذبه الکترواستاتیکی بین گروه های آنیونی صمغ زانتان و گروه های کاتیونی ریزذرات زئین شد. در نتیجه حلالیت بالاتر، باعث پراکندگی بهتر ریزذرات زئین شده است. به این معنا که صمغ زانتان، ریزذرات را محبوس کرده و یک ساختار موزائیکی تشکیل داد و مانع تجمع ریزذرات شد.

این مطالعه با هدف ارزیابی اثرات متقابل و ترکیبی فرآیندهای حرارتی (۸۰ درجه سانتی گراد)، ریزذره سازی برشی^۱ و افزودن صمغ زانتان بر خواص فیزیکو شیمیایی، ساختاری و عملکردی ایزوله پروتئین خلر است. متغیرهای مستقل شامل نوع تیمار (پروتئین خام، تیمار حرارتی، ریزذره سازی برشی و ترکیب آن ها با زانتان) و متغیرهای پاسخ شامل بازده ریزذره، حلالیت، ظرفیت نگهداری آب و روغن (WHC/OHC)، شاخص های امولسیون کنندگی (EACI/EASI) و کمترین غلظت تشکیل ژل (LGC)، اندازه ذرات نمونه ریزذره شده (DLS)، میکروسکوپ فلورسانس، شاخص پایداری (PDI)، عدد ساتر، DPI می باشند. فرضیه این تحقیق بر این است که ترکیب ریزذره سازی برشی و صمغ زانتان از ممانعت از مایکرو-آگلومراسیون ناشی از حرارت، منجر به بهبود چشمگیر ویژگی های عملکردی پروتئین خلر خواهد شد.

مواد و روش ها

مواد

دانه خلر از شرکت ۸۰۴ در همدان، ایران خریداری شد. دانه بعد از تمیز شدن، توسط آسیاب IKA ساخت کشور آلمان بدم پوست گیری آسیاب و سپس الک (مش ۵۰) شد. تمام معرف ها و مواد شیمیایی دیگر از گروه Merck (Merck KGaA، دارمشتات، آلمان) تهیه شدند.

طراحی آزمایش و گروه های آزمایشی

به منظور بررسی اثرات متقابل عملیات حرارتی، ریزذره سازی برشی و حضور صمغ زانتان، کلیه آزمون ها در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD) با ۵ تیمار اصلی و در ۳ تکرار مستقل (Triplicate) اجرا شدند. ایزوله پروتئین خام خلر (بدون هیچ گونه فرآوری حرارتی یا برشی) به عنوان نمونه شاهد (Control) در نظر گرفته شد. مشخصات دقیق، کدهای اختصاری و اجزای تشکیل دهنده هر یک از گروه های آزمایشی در جدول ۱ خلاصه شده است.

جدول ۱- طراحی آزمایش و گروه های آزمایشی

نمونه	عملیات
نمونه ۱	ایزوله پروتئین خام خلر (GPI)، به عنوان شاهد
نمونه ۲	پروتئین تیمار حرارت داده شده ایزوله پروتئین خلر (فرآیند حرارتی ۸۰ درجه سلیسیوس به مدت ۳۰ دقیقه) (HGPI)
نمونه ۳	پروتئین تیمار حرارت داده شده ایزوله پروتئین خلر و صمغ زانتان (صمغ زانتان ۳ درصد وزنی/وزنی) (HGPI+XG)
نمونه ۴	پروتئین تیمار حرارت داده شده ایزوله پروتئین خلر و ریزذره سازی شده (ریزذره سازی برشی با دستگاه Ultra-Turrax با سرعت ۱۰,۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه) (HGPI+MPs)

^۱Ultra-Turrax

استخراج پروتئین از دانه خلر

برای استخراج پروتئین از روش قلیایی استفاده شد. پودر خلر را با نسبت ۱ به ۱۰ با آب (۱ گرم آرد خلر با ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر) مخلوط و یک ساعت با همزن مغناطیسی مخلوط شد. سپس با استفاده از سود یک نرمال، pH را روی ۹/۷ تنظیم و مجدداً مخلوط به مدت ۴۵ دقیقه با همزن مغناطیسی، سرعت ۳۶۰ دور در دقیقه، هم زده شد. به منظور جداسازی ناخالصی‌ها محلول به مدت ۳۰ دقیقه و سرعت ۷۶۰۰ xg سانتریفیوژ گردید. فاز رویی جدا و با افزودن هیدروکلریک‌اسید یک نرمال pH روی ۴/۲ تنظیم شد که نقطه ایزوالکتریک پروتئین خلر است. سپس جداسازی پروتئین با سانتریفیوژ محلول به مدت ۱۵ دقیقه و سرعت ۷۶۰۰ xg انجام شد. رسوب پروتئینی حاصل پس از خنثی سازی pH، توسط خشک‌کن انجمادی، به مدت ۲۴ ساعت و در دمای -۴۶ درجه‌ی سلسیوس و فشار ۰/۰۸ میلی‌بار خشک و با آسیاب پودر شد. در نهایت پودر پروتئین الک (با مش ۵۰) و تا زمان مصرف در ظروف در بسته در یخچال نگهداری شد (Feyzi et al., 2018; Youshanlouei et al., 2024).

تعیین ترکیبات تشکیل‌دهنده ایزوله پروتئین استخراجی، بازده استخراج، محتوای پروتئین

مقدار پروتئین با روش کلدال (Morr et al., 1985)، رطوبت، چربی و خاکستر به روش AOAC محاسبه گردید. بازده استخراج نیز از رابطه (۱) به دست آمد. نیتروژن کل با روش کلدال با استفاده از ضریب تبدیل ۶/۲۵ تعیین شده بود (AOAC, 2000). بازده پروتئین نیز از رابطه (۲) محاسبه شد (Achouri et al., 2012).

$$\text{رابطه (۱)} \quad (\%) = \frac{w_1}{w_2} \times 100$$

$$\text{رابطه (۲)} \quad (\%) = \frac{w_1 \times c_1}{w_2 \times c_2} \times 100$$

w_1 مقدار وزن پروتئین ایزوله خلر (گرم)، w_2 مقدار وزن آرد بدون چربی خلر (گرم)، c_1 محتوای پروتئین ایزوله خلر (%،) و c_2 محتوای پروتئین آرد خلر بدون چربی (%).

تولید ریزذره

ابتدا ۲۰ گرم ایزوله پروتئین خلر را با ۰/۰۶ گرم صمغ زانتان و آب مخلوط و به صورت دستی هم زده شد تا هیدراته شود. سپس pH با استفاده از اسیدلاکتیک ۱ نرمال روی ۶/۵ تنظیم گردید (حدود pH پنیر و گوشت حیوانی جهت تولید آنالوگ‌های گیاهی). ترکیب حاصل تا دمای ۸۰ درجه سلسیوس حرارت داده شد و با مشاهده سفت شدن ترکیب، به مدت دو دقیقه حرارت دهی ادامه یافت. برای تولید ریزذره از دستگاه ریزذره ساز برشی یا اولتراتوراکس (Ultra-Turrax T25، Staufen، آلمان) با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه استفاده شد. مواد در دمای اتاق خنک و توسط خشک‌کن انجمادی، به مدت ۲۴ ساعت و در دمای -۴۶ درجه‌ی سلسیوس و فشار ۰/۰۸ میلی‌بار خشک و سپس با آسیاب پودر شد. نمونه برای انجام آزمون‌ها در یخچال نگهداری شد (Amagliani et al., 2020).

ارزیابی ریزذره

به ۵ گرم نمونه‌های ۴ و ۵، ۱۰ CC آب اضافه گردید و با همزن مغناطیسی به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۳۵۰ rpm همزنی شد. سپس ۱۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰ xg سانتریفیوژ شد. رسوب جداسازی شده توسط خشک‌کن انجمادی، به مدت ۲۴ ساعت و در دمای -۴۶ درجه‌ی سلسیوس و فشار ۰/۰۸ میلی‌بار خشک و سپس جرم محاسبه شد. بازده ریزذره از رابطه ۳ تعیین شد (Silva et al., 2025).

$$\text{رابطه (۳)} \quad R (\%) = \frac{m_i}{m_0} \times 100\%$$

R بازده ریزذره (%،) m_1 جرم ریزذرات جداسازی شده (g)، m_0 جرم نمونه اولیه قبل از انجام آزمون (g)

حالات

به منظور اندازه گیری حالات، ۵۰۰ میلی گرم نمونه در ۵۰ میلی لیتر آب مقطر حل و با استفاده از HCl (۰/۱ مولار) و NaOH (۰/۱) pH محلول در مقادیر مختلف ۲ تا ۹ تنظیم شد. با ۶۰۰ میکرو لیتر نمونه برداشته شده، مقدار پروتئین کل محلول با روش بردفورد در طول موج ۵۹۵ نانومتر تعیین شد (Ahern & Klibanov, 1985). سپس محلول باقیمانده به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۴۰۰۰ × سانتریفیوژ و محتوای پروتئین سوپرناتانت (پروتئین محلول) به روش مذکور اندازه گیری شد. منحنی استاندارد نیز به روش بردفورد با پروتئین آلبومین سرم گاوی رسم شد (Ahern & Klibanov).

ارزیابی ظرفیت کف کنندگی (FC) و پایداری کف (FS)

FC و FS بر اساس روش Gundogan و Karaca (۲۰۲۰) اندازه گیری شدند. محلول پروتئین (۱ درصد) به صورت وزنی/حجمی تهیه و pH آن روی ۷ تنظیم شد. سپس محلول با استفاده از ریزدنه ساز برشی (Staufen, IKA, Ultra-Turrax T25، آلمان) ۳ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه هم زده شد. حجم کف بلافاصله پس از هم زنی و ۲ ساعت پس از آن تعیین شد. محاسبه FC و FS توسط روابط (۵) و (۶) انجام شدند:

$$FC (\%) = \frac{v_1 - v_0}{v_0} \times 100 \quad \text{رابطه (۵)}$$

$$FS (\%) = \frac{v_2}{v_1} \times 100 \quad \text{رابطه (۶)}$$

v_0 (میلی لیتر) حجم اولیه، v_1 (میلی لیتر) حجم کف بلافاصله پس از ریزدنه سازی برشی و v_2 (میلی لیتر) حجم کف پس از ۲ ساعت

ارزیابی شاخص فعالیت امولسیون کننده (EAI) و شاخص پایداری امولسیون (ESI)

۱۵ میلی لیتر محلول پروتئین (۱٪) وزنی/حجمی با pH ۷، با ۵ میلی لیتر روغن آفتابگردان مخلوط شد و به مدت ۳ دقیقه توسط ریزدنه ساز برشی (Staufen, IKA, Ultra-Turrax T25، آلمان) با دور ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه مخلوط شد. بلافاصله از انتهای لوله ۵۰ میکرو لیتر امولسیون گرفته شد و به آن ۵ میلی لیتر SDS ۰/۱ درصد افزوده شد. جذب امولسیون با استفاده از اسپکتروفتومتر (UV500DB، چین) در طول موج ۵۰۰ نانومتر خوانده شد. با استفاده از همین روش پایداری امولسیون پس از گذشت ۱۰ دقیقه اندازه گیری شد (Karaca et al., 2011). EAI و ESI با استفاده از روابط (۷) و (۸) محاسبه شدند:

$$EAI (m^2/g) = \frac{2 \times \frac{V}{V_0} \times A_0 \times N}{C \times \varphi \times 1000} \quad \text{رابطه (۷)}$$

$$ESI (min) = \frac{A_0}{\Delta A} \times t \quad \text{رابطه (۸)}$$

A_0 جذب امولسیون رقیق شده پس از آماده سازی، N ضریب رقت، C غلظت نمونه (mg/mL)، φ کسر حجمی روغن (۰/۲۵)، ΔA تغییر در جذب بین ۰ تا ۱۰ دقیقه ($A_0 - A_{10}$)، t بازه زمانی (۱۰ دقیقه)

⁂Foaming capacity (FC)

⁂Foam stability (FS)

⁂Emulsifying Activity Index (EAI)

⁂Emulsion Stability Index (ESI)

ظرفیت جذب آب (WAC) و روغن (OAC) و نگهداری آب (WHC) و روغن (OHC)

یک گرم نمونه با ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر داخل لوله آزمایش با وزن مشخص، مخلوط شد. نمونه به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق (۲۵ درجه سلسیوس) قرار داده شد. سپس نمونه به مدت ۳۰ دقیقه در دور ۴۰۰۰ × سانتریفیوژ و مایع رویی تخلیه شد. در نهایت رسوب حاصل و لوله آزمایش توزین شد. برای آزمون ظرفیت جذب روغن به جای آب مقطر از روغن آفتابگردان تجاری استفاده شد. نسبت WAC یا OAC نمونه به صورت رابطه (۹) محاسبه شد (Timilsena et al., 2016).

$$\text{WAC/OAC (g/g)} = \frac{w_2 - w_1}{w_0} \quad \text{رابطه ۹}$$

w_0 (g) وزن پروتئین، w_1 (g) وزن لوله آزمایش و نمونه، و w_2 (g) وزن لوله آزمایش و رسوب برای اندازه‌گیری ظرفیت نگهداری آب (WHC)، ۱۵ گرم نمونه در آب به مدت ۲۰ دقیقه، در دمای اتاق همزده شد. سپس، نمونه به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۵۰۰۰ × سانتریفیوژ و روی صافی به مدت ۵ دقیقه تخلیه شد. برای اندازه‌گیری ظرفیت نگهداری روغن به جای آب از روغن آفتابگردان تجاری استفاده شد. WHC و OHC با استفاده از رابطه (۱۰) محاسبه شد (Traynham et al., 2007).

$$\text{WHC/OHC (\%)} = \frac{w_2}{w_1} \times 100 \quad \text{رابطه ۱۰}$$

w_2 (g) وزن لوله آزمایش و رسوب بعد از تخلیه، w_1 (g) وزن لوله آزمایش و نمونه قبل از سانتریفیوژ

تعیین کمترین غلظت تشکیل ژل (LGC)

محلول نمونه‌های پروتئینی با غلظت ۲ تا ۲۰ درصد (وزنی/وزنی) تهیه شد. سپس نمونه‌ها ۱ ساعت در حمام آب‌جوش قرار داده شدند. پس از آن نمونه‌ها به سرعت خنک شد. بعد از ۲ ساعت نگهداری در یخچال، لوله‌ها به صورت واژگون قرار گرفت. حداقل میزان ژل‌شدگی مربوط به نمونه‌ای است که جریان نداشته و سرازیر نشد (Mohd Shukri et al., 2022; Tang et al., 2024).

پراکندگی نور دینامیکی (DLS)

اندازه ذرات پروتئین ایزوله خلر حرارت‌دیده با ریزدنه، صمغ زانتان (نمونه ۵) (زیرا داده‌های DLS بقیه نمونه‌ها به دلیل ماکرو-آگلومراسیون خارج از محدوده سنجش DLS بوده است) و شاخص پراکندگی^۷ (PDI) همه نمونه‌ها با استفاده از پراکندگی نور دینامیکی (DLS) (HORIBA, Zetasizer، امریکا) اندازه‌گیری شد. این دستگاه فقط ذرات زیر چند میکرون را دقیق مورد سنجش قرار می‌دهد. اندازه ذرات نمونه پس از ۱۰۰ بار رقیق کردن در آب دیونیزه (جهت رسیدن به غلظت مناسب دستگاه، ۰/۰۱ درصد وزنی و جلوگیری از

^۱Water absorption capacity (WAC)

^۲Oil absorption capacity (OAC)

^۳water holding capacity (WHC)

^۴Oil holding capacity (OHC)

^۵Lowest gel forming concentration (LGC)

^۶Dynamic Light Scattering (DLS)

^۷polydispersity index (PDI)

پراکندگی چندگانه نور) و در pH ۶/۵ اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری‌ها با نمونه‌های تازه تهیه شده در دمای ثابت ۲۵ درجه سلیسیوس و زاویه ۹۰ درجه انجام شد (Khan et al., 2019). PDI از رابطه (۴) به دست آمد (Frigerio et al., 2026).

$$PDI = \frac{\mu_2}{\bar{r}^2} \quad \text{رابطه (۴)}$$

PDI شاخص پراکندگی، μ_2 گشتاور دوم مرکز، $\bar{r}^2$ مربع گامای میانگین

محاسبه عدد ساتر

جهت تعیین یکنواختی ذرات لازم است قطر متوسط قطره‌ها (قطر حجمی - سطحی) به دست آید. با استفاده از تصاویر میکروسکوپ فلورسانس و نرم افزار Image J قطر متوسط ذرات (عدد ساتر) توسط رابطه (۱۱) به دست آمد.

$$d_{\text{sat}} = \frac{\sum_{i=1}^N n_i d_i^3}{\sum_{i=1}^N n_i d_i^2} \quad \text{رابطه (۱۱)}$$

از نسبت d_{sat} به d_{sat} یکنواختی ذرات ارزیابی شد.

میکروسکوپ فلورسانس

مطالعه ساختار پروتئین‌ها با میکروسکوپ نوری (Jena, ZIESS، آلمان) در حالت فلورسانس انجام گرفت. ۲۰ میکرولیتر نمونه (۱ درصد) تهیه و یک قطره رودامین B به نمونه‌ها اضافه شد. مقداری از نمونه بر روی لام قرار داده شد و به مدت یک ساعت در تاریکی قرار گرفت. ساختار نمونه‌ها با بزرگنمایی ۴۰× بررسی شد. نمونه‌ها حداقل ۲۰ بار تصویربرداری شدند و تصاویر با نرم افزار ImageJ بررسی شدند (Youshanlouei et al., 2022).

تعیین گروه سولفیدریل آزاد (SH_F) و گروه سولفیدریل پیوندی (SS)

ابتدا ۳۰ میلی گرم از نمونه را در ۱۰ میلی لیتر بافر تریس-گلايسين (تریس ۰/۰۸۶ مولار، گلايسين ۰/۰۹ میلی مولار، EDTA ۴ میلی مولار، PH=۸) حل شد. ۸ مول اوره، ۵۰ میلی لیتر معرف المان (۵،۵-دیتيو-بسیس-۲-نیتروبنزوئیک اسید در بافر تریس-گلايسين ۴ میلی گرم بر میلی مول) به محلول افزوده و مخلوط شد. سپس در دمای محیط به مدت ۶۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفت. در نهایت محلول در دور ۷۰۰۰× به مدت ۸ دقیقه سانتریفوژ و جذب مایع رویی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری (۴۱۲ نانومتر) ثبت شد. از بافر تریس-گلايسين حاوی معرف المان به عنوان شاهد استفاده شد. به این ترتیب SH آزاد به دست آمد.

برای اندازه‌گیری پیوندهای سولفیدریل کل (SH_T)، ۱۵ میلی گرم پروتئین در ۱۰ میلی لیتر بافر تریس-گلايسين و ۸ مول اوره حل شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر ۲-مرکپتانول اضافه و محلول در دمای محیط به مدت ۶۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفت. ۱۰ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید ۱۲ درصد به رسوبات افزوده و سانتریفوژ شد (۱۰ دقیقه با دور ۷۰۰۰×). پس از سانتریفوژ به منظور حذف ۲-مرکپتانول، رسوبات سه مرتبه با ۱۰ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید ۱۲ درصد شستشو شد. در نهایت ۵۰ میکرولیتر معرف المان به

^۱Free sulfhydryl (SH_F)

^۲Sulfhydryl group (SS)

^۳Total sulfhydryl bonds (SH_T)

محلول اضافه گردید و جذب با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری (۴۱۲ نانومتر) ثبت شد. برای محاسبه SH_F و SS از روابط (۱۲) و (۱۳) استفاده شد (Cao et al., 2022).

$$SH_F (\mu M/g) = \frac{73 \times A_{412} \times D}{52} \quad \text{رابطه ۱۲}$$

$$SS (\mu M/g) = \frac{SH_T - SH_F}{2} \quad \text{رابطه ۱۳}$$

D ضریب رقت، C غلظت نمونه

تجزیه و تحلیل آماری

در مطالعه حاضر، نتایج اثر حرارت دهی، افزودن صمغ زانتان و ریزذره کردن بر خواص فیزیکوشیمیایی ارائه و بررسی شد. تمامی اندازه‌گیری‌ها در سه تکرار انجام شد و به منظور انجام تحلیل واریانس از نرم افزار SPSS 22 نسخه ۲۲، IBM، (ایالات متحده آمریکا) استفاده شد. مقایسه میانگین داده‌های به‌دست‌آمده نیز با آزمون تعقیبی-توکی در سطح معنی‌داری $p < 0.05$ مورد ارزیابی قرار گرفتند (Garbowska et al., 2023).

نتایج و بحث‌ها

ویژگی‌های اصلی پودر دانه و ایزوله پروتئین استخراج شده

ترکیب شیمیایی آرد خلر و پودر ایزوله خلر در جدول ۲ ارائه شده است. طی فرآیند استخراج قلیایی میزان چربی، رطوبت، فیبر و خاکستر کاهش یافت. آرد خلر حاوی میانگین پروتئین ۳۰/۴۵ درصد بود و پس از استخراج ایزوله‌ی پروتئینی با میانگین پروتئین ۹۱/۲۷ درصد به‌دست آمد که ترکیب اصلی مورد نیاز برای تولید نمونه‌ها بود. با توجه به منابع، بطور معمول درصد پروتئین حبوبات حدود ۲۰ تا ۳۰ درصد است (Mozafarpour et al., 2022; Youshanlouei et al., 2022). تفاوت در ترکیب ایزوله‌ی پروتئین خلر در مطالعات مختلف می‌تواند ناشی از تغییرات در روش‌های خشک کردن، زمان استخراج و سطوح pH باشد (Feyzi et al., 2018).

جدول ۲- ترکیبات شیمیایی

نمونه	پروتئین	کربوهیدرات	چربی	رطوبت	فیبر	خاکستر
پودر خلر	۳۰/۴۵ ± ۰/۷۴	۳۹/۲۱ ± ۰/۱۷	۳/۶۹ ± ۰/۴۷	۹/۹۲ ± ۰/۴۰	۸/۰۲ ± ۰/۸۸	۸/۷۱ ± ۰/۵۲
ایزوله خلر	۹۱/۲۷ ± ۰/۸۹	۲/۴۴ ± ۰/۰۶	۰/۳۴ ± ۰/۰۷	۰/۸۱ ± ۰/۰۱	۱/۰۲ ± ۰/۱۴	۴/۱۲ ± ۰/۰۸

داده‌ها نشان‌دهنده میانگین ۳ تکرار ± انحراف استاندارد است

بررسی فرآیند استخراج

در جدول ۳ درصد بازده استخراج و بازده پروتئین و محتوا آن آورده شده است. این شاخص‌ها در جدایه‌های پروتئینی بسیار مهم هستند. زیرا بر ویژگی‌های عملکردی محصول و امکان‌سنجی اقتصادی مؤثرند (Youshanlouei et al., 2022).

جدول ۳- ترکیبات شیمیایی پروتئین ایزوله خلر

نمونه	بازده استخراج %	محتوای پروتئین %	بازده پروتئین %
پروتئین ایزوله خلر	۱۴/۰۴ ± ۰/۰۶	۹۱/۲۷ ± ۰/۸۹	۴۹/۴۰ ± ۰/۸۵

داده‌ها نشان‌دهنده میانگین ۳ تکرار ± انحراف استاندارد است

ارزیابی ریزذرات

حرارت سبب دناتوراسیون پروتئین و به دنبال آن تجمع ذرات و عدم یکنواختی در بافت می‌شود. تبدیل ذرات به ریزذره سبب رفع این مشکل و افزایش پایداری محصول می‌شود (Tanger et al., 2021). ارزیابی ریزذرات در دو نمونه پروتئین ایزوله خلر حرارت‌دیده با

ریزذره و پروتئین ایزوله خلر حرارت‌دیده با ریزذره و صمغ زانتان انجام و نتایج در جدول ۴ آورده شد. نتایج نشان داد که در نمونه پروتئین ایزوله خلر حرارت‌دیده با ریزذره ۸۴/۸۳ درصد ذرات به صورت ریزذره در آمده‌اند در حالیکه در نمونه پروتئین ایزوله خلر حرارت‌دیده با ریزذره و صمغ زانتان افزایش یافته و به ۹۲/۰۳ درصد رسیده است که حاکی از اینست که افزودن صمغ زانتان از به هم چسبیدن ریزذرات جلوگیری کرده و راندمان ریزذره سازی را افزایش داده است. پس پایداری بیشتری را ایجاد می‌کند (Wu et al., 2025).

جدول ۴- ارزیابی ریزذرات

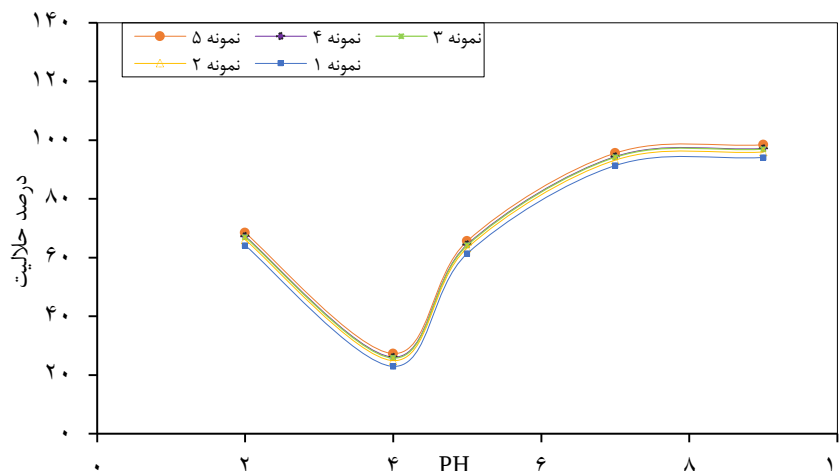
نمونه	m_0 (g)	m_i (g)	R (%)
نمونه ۱	$5/01 \pm 0/08$	$4/25 \pm 0/07$	$84/83 \pm 0/03^a$
نمونه ۲	$5/00 \pm 0/04$	$4/60 \pm 0/11$	$92/03 \pm 0/05^b$

داده‌ها نشان‌دهنده میانگین ۳ تکرار $\pm$ انحراف استاندارد است. حروف مختلف تفاوت معنی‌داری ($p < 0/05$) بین گروه‌ها در ستون یکسان را نشان می‌دهند.
 نمونه ۱ (پروتئین ایزوله خلر حرارت‌دیده با ریزذره)، نمونه ۲ (پروتئین ایزوله خلر حرارت‌دیده با ریزذره، صمغ زانتان)،
 m_0 (جرم نمونه اولیه قبل از انجام آزمون)، m_i (جرم ریزذرات جداسازی شده)، R (%) بازده ریزذرات

نتایج حالات

یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های پروتئین‌ها حالات آن است. که بر روی سایر عملکردهای پروتئین مانند خواص امولسیون، پایداری حرارتی، کف‌کنندگی و ژل شدن و غیره تأثیرگذار است (Hu et al., 2023). در شکل ۲ حالات نمونه‌های پروتئینی و ریزذرات نشان داده شده است. همانطور که در شکل مشاهده می‌شود، حالات نمونه‌ها تحت تأثیر pH پروفایل مشابهی داشت. کمترین حالات در pHهای مختلف مربوط به نمونه ۱ (پروتئین ایزوله خلر) و بیشترین حالات مربوط به نمونه ۵ (پروتئین ایزوله خلر حرارت‌دیده با ریزذره، صمغ زانتان) بود. افزایش حالات ممکن است به دلیل تغییرات ساختاری ایجاد شده باشد. در اثر حرارت دهی، افزودن صمغ زانتان و وجود ریزذرات حالات بهبود یافت و در نمونه ۵ وجود صمغ زانتان و ریزذرات اثر ترکیبی داشتند و بهبود یافتند و بیشترین حالات را نشان داد.

حالات پروتئین در pHهای مختلف بر اساس نسبت نیتروژن محلول به دست می‌آید (Zayas, 2012). حالات در pH چهار کمترین است. پس نمونه‌ها در نقطه ایزوالکتریک (PI) کمترین حالات را دارند. مشاهده شد زمانی که pH نسبت به نقطه ایزوالکتریک کمتر یا بیشتر می‌شود، بار الکتریکی خالص به دلیل وجود گروه‌های کربوکسیل (تمایل به منفی شدن) و گروه‌های آمین (تمایل به مثبت شدن) از حالت خنثی خارج شده و نیروی دافعه پروتئین‌ها افزایش می‌یابد ایجاد نیروی دافعه الکترواستاتیک سبب افزایش حالات می‌شود (Shen and Tang, 20۱۲)، دریافتند (Ma et al., 2018; Pastor-Cavada et al., 2010; Saatchi et al., 2019; Timilsena et al., 2016) که ریزذره کردن حالات را تا حد زیادی بهبود می‌بخشد. آنها تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی جدید بین زیر واحدهای پروتئین سویا را گزارش کردند. به دلیل برش زیاد در طول ریزذره‌سازی، ذرات بزرگ نامحلول به ذرات کوچکتر محلول تبدیل شد.

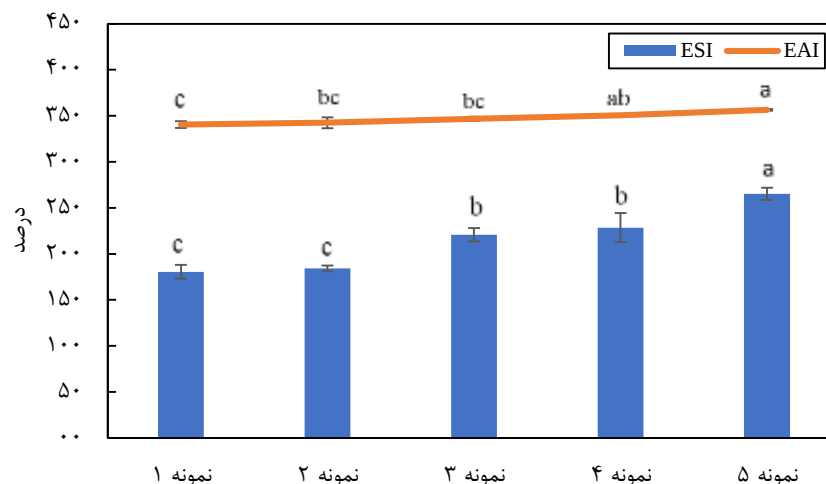


شکل ۲-۳- حلالیت

نمونه ۱ (پروتئین ایزوله خلر)، نمونه ۲ (پروتئین ایزوله خلر حرارت دیده)، نمونه ۳ (پروتئین ایزوله خلر حرارت دیده با صمغ زانتان)، نمونه ۴ (پروتئین ایزوله خلر حرارت دیده با ریزفره)، نمونه ۵ (پروتئین ایزوله خلر حرارت دیده با ریزفره، صمغ زانتان)

ویژگی‌های امولسیون‌کنندگی

ویژگی‌های امولسیون‌کنندگی نمونه‌ها در شکل ۳ آورده شده است. نتایج نشان می‌دهد که نمونه ۱ پایین‌ترین و نمونه ۵ بالاترین ظرفیت امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون را دارد. به علت کوتاه شدن زنجیره‌های پروتئین و به سطح آمدن گروه‌های آبدوست و آبگریز توانایی جذب آب و روغن توسط پیوندهای هیدروژنی و برهمکنش آبگریزی برای ایجاد امولسیون افزایش یافته است. صمغ زانتان نیز به دلیل آبدوستی امکان ایجاد پیوند هیدروژنی را افزایش می‌دهد و باعث هم‌افزایی در نمونه ۵ شده است (قربانیان و همکاران، ۱۳۹۵). این شاخص با اندازه‌گیری حداکثر مقدار روغن قابل امولسیون شدن با یک پروتئین تعریف شده است (Schlegel et al., 2019). پروتئین‌ها به دلیل ماهیت آبدوستی‌شان کشش سطحی را در فصل مشترک روغن و آب کاهش می‌دهند. پروتئین‌ها با این خاصیت توانایی تشکیل امولسیون (روغن در آب یا آب در روغن) را دارا هستند. برای استفاده‌ی گسترده‌تر از این نوع امولسیون‌ها نوع ترکیب، pH، شرایط حلال و عملیات حرارتی پروتئین امکان کاربردهای مختلف را فراهم کرده‌است (Wang et al., 2024). عملیات حرارتی می‌تواند به طور قابل توجهی بر ساختار پروتئین و عملکرد آن تأثیر بگذارد (Zhang & Romero, 2020). Arteaga et al. (۲۰۲۰)، دریافته‌اند که تشکیل ذرات بزرگ با وزن مولکولی بالا و غیر قابل انعطاف در اثر حرارت می‌تواند کاهش خاصیت امولسیون‌کنندگی را به دنبال داشته باشد. پس اندازه ذرات یک عامل کلیدی برای بهبود امولسیون‌کنندگی می‌تواند باشد.



شکل ۳- خاصیت امولسیون کنندگی و پایداری آن

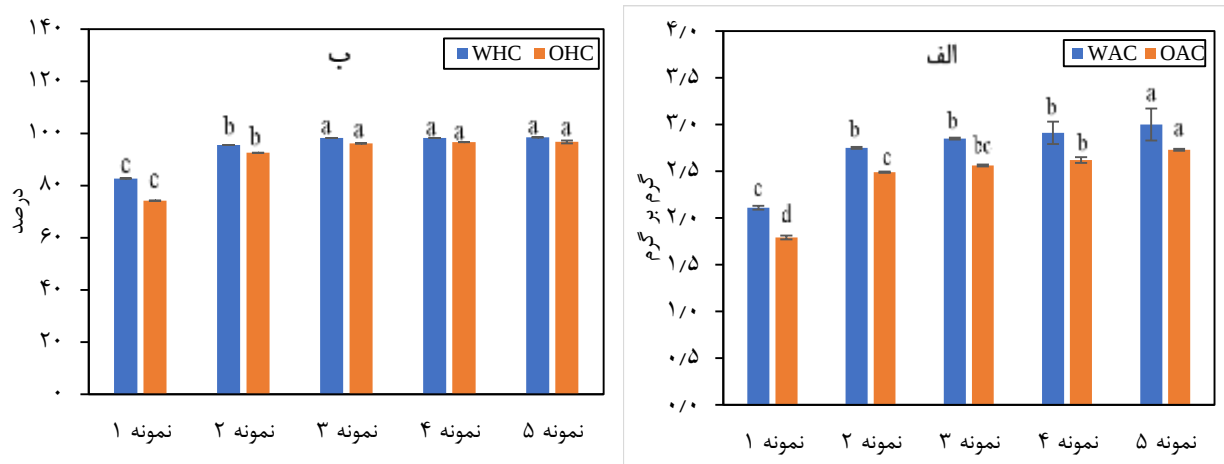
داده‌ها نشان‌دهنده میانگین ۳ تکرار $\pm$ انحراف استاندارد است. حروف مختلف تفاوت معنی‌داری ($p < 0.05$) بین گروه‌ها در ستون یکسان را نشان می‌دهند. نمونه ۱ (پروتئین ایزوله خلر)، نمونه ۲ (پروتئین ایزوله خلر حرارت‌دیده)، نمونه ۳ (پروتئین ایزوله خلر حرارت‌دیده با صمغ زانتان)، نمونه ۴ (پروتئین ایزوله خلر حرارت‌دیده با ریزدره)، نمونه ۵ (پروتئین ایزوله خلر حرارت‌دیده با ریزدره، صمغ زانتان)

ظرفیت جذب و نگهداری آب و روغن

نتایج بررسی ظرفیت جذب و نگهداری آب و روغن (OAC/WAO و OHC/WHC) نمونه‌ها در شکل ۴ آمده است. نتایج نشان می‌دهد که ریزدره کردن، افزودن صمغ زانتان و حرارت دادن پروتئین سبب افزایش معنی‌دار ($p < 0.05$) OAC و WAO نسبت به ایزوله پروتئین خلر می‌شود. بیشترین ظرفیت جذب آب مربوط به نمونه ۵ (3.00 g/g) است. در نمونه ۲ پیوندها در اثر حرارت باز شده ولی برهم‌کنش پروتئین با پروتئین سبب تجمع دوباره شده. در نمونه ۳ پیوندهای هیدروژنی ایجاد شده و جذب آب در آن افزایش یافته است. در نمونه ۴ پیوندهای هیدروژنی بیشتر شده، زیرا جذب آب بالا رفته است. وجود ریزدره و صمغ زانتان در نمونه ۵ توانسته پیوندهای هیدروژنی بیشتری را ایجاد کند زیرا جذب آب آن از سایر نمونه‌ها بیشتر است. در واقع حرارت سبب باز شدن زنجیره‌های پروتئین شده و امکان ایجاد پیوند هیدروژنی با آب را برای پروتئین و صمغ زانتان فراهم کرده است. بیشترین ظرفیت جذب روغن مربوط به نمونه ۵ (2.73 g/g) بود. محصولات پروتئین گیاهی بافت‌دار معمولاً ساختاری لایه‌ای و در عین حال متخلخل دارند (Webb et al., 2023b). کارهای قبلی نشان داده است که استفاده از نیروی برشی تأثیر زیادی بر WHC دارد (Webb et al., 2020).

بیشترین ظرفیت نگهداری آب و روغن مربوط به نمونه ۵ ($98/49$ و $96/77$ ٪) بود. ظرفیت نگهداری آب (WHC) یک پروتئین گیاهی به توانایی آن در حفظ آب هنگام قرار گرفتن در معرض نیروهای خارجی مانند فشرده‌سازی یا برش اشاره دارد. در علوم غذایی، این خاصیت در تعیین بافت، آبدار بودن و تجربه حسی کلی محصولات غذایی مهم است. پروتئین‌های گیاهی با WHC بالا می‌توانند به رطوبت و شادابی در محصولات غذایی مانند گوشت گیاهی یا محصولات پخته شده گیاهی کمک کنند. در تحقیق Webb et al. (2023a)، پروتئین نخود دارای بالاترین WHC بود. ظرفیت نگهداری روغن (OHC) نیز توانایی پروتئین گیاهی در حفظ روغن یا چربی را نشان می‌دهد. این ویژگی در توزیع و نگهداری روغن، بافت محصول، احساس دهانی و آزاد شدن طعم اهمیت دارد. پروتئین‌های گیاهی با OHC بالا می‌توانند سبب ایجاد امولسیون‌ها و بهبود بافت شوند. همچنین جایگزین چربی در فرمول‌های غذایی باشند. ظرفیت نگهداری آب و ظرفیت نگهداری روغن پروتئین‌های گیاهی، ویژگی‌های عملکردی کلیدی هستند که بر ویژگی‌های حسی و کیفیت

کلی محصولات غذایی تأثیر می‌گذارند. در تحقیق Tang et al. (۲۰۲۴)، ظرفیت نگهداری آب (WHC) نمونه نخود بیشتر از سویا و عدس و کمتر از پروتئین آب‌پنیر بود.



شکل ۴- ظرفیت جذب آب و روغن (الف)؛ ظرفیت نگهداری آب و روغن (ب)

داده‌ها نشان‌دهنده میانگین ۳ تکرار $\pm$ انحراف استاندارد است. حروف مختلف تفاوت معنی‌داری ($P < 0.05$) بین گروه‌ها در ستون یکسان را نشان می‌دهند. نمونه ۱ (پروتئین ایزوله خمر)، نمونه ۲ (پروتئین ایزوله خمر حرارت‌دیده)، نمونه ۳ (پروتئین ایزوله خمر حرارت‌دیده با صمغ زانتان)، نمونه ۴ (پروتئین ایزوله خمر حرارت‌دیده با ریزدره)، نمونه ۵ (پروتئین ایزوله خمر حرارت‌دیده با ریزدره، صمغ زانتان)

ویژگی‌های کف‌کنندگی و پایداری کف

معمولاً برای ارزیابی توانایی کف‌زایی پروتئین‌ها از پارامترهای ظرفیت کف‌کنندگی (FC) و پایداری کف (FS) استفاده می‌شود. به‌طور کلی، پدیده کف کردن پروتئین‌ها شامل باز شدن ساختاری، انتشار سریع، جهت‌گیری مجدد، برهم‌کنش و غلظت پروتئین در سطح مشترک گاز و مایع است (Tan et al., 2023). نتایج بررسی کف‌کنندگی (FC) و پایداری کف (FS) نمونه‌ها در جدول ۵ نشان داده شده است. بیشترین ظرفیت کف‌کنندگی و پایداری کف مربوط به نمونه ۱ (۳۹/۰۳ و ۹۰/۲۹ درصد) و کمترین آن مربوط به نمونه ۵ (۱۵/۵۳ و ۸۳/۷۲ درصد) است. که نشان‌دهنده تأثیر وجود حرارت، صمغ زانتان و ریزدره بر کم شدن ظرفیت کف‌کنندگی و پایداری آن است که سبب بهبود همزنی و کاهش مشکلات ناشی از کف می‌شود مقدار ظرفیت کف‌کنندگی (FC) ایزوله پروتئین خمر در تحقیق Youshanlouei et al. (۲۰۲۴)، ۴۸/۱۳ درصد بود که بیشتر از نتیجه مطالعه حاضر بود. این اختلاف احتمالاً به دلیل تفاوت در ترکیب ایزوله پروتئین خمر، روش‌های خشک کردن، زمان استخراج و سطوح pH است.

جدول ۵- ظرفیت کف‌کنندگی و پایداری کف

نمونه‌ها	(%) FC	(%) FS
نمونه ۱	۳۹/۰۳ $\pm$ ۰/۲۷ ^a	۹۰/۲۹ $\pm$ ۰/۱۶ ^a
نمونه ۲	۳۰/۴۰ $\pm$ ۰/۲۳ ^b	۸۹/۹۲ $\pm$ ۰/۴۷ ^a
نمونه ۳	۲۴/۶۷ $\pm$ ۰/۵۳ ^c	۸۸/۵۲ $\pm$ ۰/۴۲ ^b
نمونه ۴	۲۰/۷۰ $\pm$ ۰/۲۶ ^d	۸۶/۱۴ $\pm$ ۰/۳۵ ^c
نمونه ۵	۱۵/۵۳ $\pm$ ۰/۳۰ ^e	۸۳/۷۲ $\pm$ ۰/۵۵ ^d

داده‌ها نشان‌دهنده میانگین ۳ تکرار $\pm$ انحراف استاندارد است. حروف مختلف تفاوت معنی‌داری ($P < 0.05$) بین گروه‌ها در ستون یکسان را نشان می‌دهند.

نمونه ۱ (پروتئین ایزوله خلر)، نمونه ۲ (پروتئین ایزوله خلر حرارت‌دیده)، نمونه ۳ (پروتئین ایزوله خلر حرارت‌دیده با صمغ زانتان)، نمونه ۴ (پروتئین ایزوله خلر حرارت‌دیده با ریزدره)، نمونه ۵ (پروتئین ایزوله خلر حرارت‌دیده با ریزدره، صمغ زانتان)، ظرفیت کف‌کنندگی FC (%)، پایداری کف FS (%)

تعیین کمترین غلظت تشکیل ژل (LGC)

اندازه‌گیری ژل شدن به دلیل کمک در به شناسایی بیشتر پروتئین‌های مختلف و به صورت غیرمستقیم (تفاوت در شیمی، ساختار و عملکرد) بسیار مفید است. در جدول ۶ کمترین غلظت تشکیل ژل نمونه‌ها نشان داده شده است. کمترین غلظت تشکیل ژل برای نمونه ۱، ۱۲ درصد بود، به این معنی که بیشترین میزان پروتئین برای تشکیل ژل را نیاز داشت و برای نمونه ۴ و ۵، کمترین میزان یعنی ۸ درصد بود. بر خلاف WAC، که یک تست حلالیت در آب سرد است، LGC فرآیند انحلال در آب گرم است. ژل شدن توانایی یک پروتئین برای تشکیل یک شبکه سه بعدی از طریق دناتوره شدن و تجمع آن در اثر گرما است (Messian et al., 2015). ساختار ژل توسط فعل و انفعالات پروتئین-پروتئین، پروتئین-پلی‌ساکارید و پیوندها و نیروهای الکترواستاتیکی شکل می‌گیرد. علاوه بر این، گرما، فشار و برش به ایجاد و جامد شدن ساختار کمک می‌کند مانند ساختار لایه‌ای آنالوگ‌های گوشت ریزدره شده (McClements & Grossmann, 2021). در تحقیق Webb et al. (2023a)، کمترین غلظت برای ژل شدن پروتئین نخود ۱۴ درصد بود ولی آنها بیان کردند برای داشتن ژل سفت باید از غلظت ۱۸ درصد استفاده کرد که بسیار بالاتر از نمونه‌های این مطالعه بود.

جدول ۶- کمترین غلظت تشکیل ژل

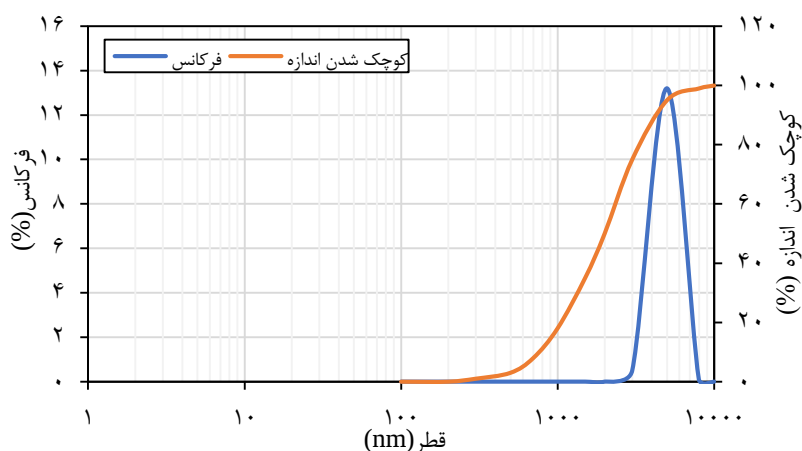
غلظت (%)	نمونه ۱	نمونه ۲	نمونه ۳	نمونه ۴	نمونه ۵
۲	-	-	-	-	-
۴	-	-	-	-	-
۶	-	-	-	-	-
۸	-	±	±	+	+
۱۰	-	+	+	+	+
۱۲	+	+	+	+	+
۱۴	+	+	+	+	+
۱۶	+	+	+	+	+
۱۸	+	+	+	+	+
۲۰	+	+	+	+	+
LGC	۱۲	۱۰	۱۰	۸	۸

نمونه ۱ (پروتئین ایزوله خلر)، نمونه ۲ (پروتئین ایزوله خلر حرارت‌دیده)، نمونه ۳ (پروتئین ایزوله خلر حرارت‌دیده با صمغ زانتان)، نمونه ۴ (پروتئین ایزوله خلر حرارت‌دیده با ریزدره)، نمونه ۵ (پروتئین ایزوله خلر حرارت‌دیده با ریزدره، صمغ زانتان)

اندازه ذرات با پراکندگی نور دینامیکی (DLS)

پراکندگی نور دینامیکی (DLS) قادر به اندازه‌گیری اندازه ذرات کوچکتر از ۱۰ میکرومتر است و اندازه‌گیری دقیق‌تری از اندازه ریزذرات ارائه می‌دهد. شکل ۱ توزیع اندازه ذرات در نمونه پروتئین ایزوله خلر حرارت‌دیده با ریزدره و صمغ زانتان (نمونه ۵) را نشان می‌دهد. میانگین اندازه ذرات گزارش شده ۶ میکرومتر بود که برای دستیابی به خواص بافتی مطلوب مناسب تلقی می‌شود. Vélez-Erazo et al. (۲۰۲۱)، نیز اندازه ذرات را از ۱۹/۱۷ تا ۲۳/۲۶ میکرومتر برای امولسیون‌های پروتئین نخود و صمغ زانتان گزارش کردند. Leon et al. (۲۰۱۶)، از میکروذرات با اندازه کوچکتر از ۱۰ میکرومتر به عنوان جایگزین‌های اصلاح‌کننده بافت در غذاهای مایع و پوره شده استفاده کردند. شاخص پراکندگی (PDI) قطر هیدرودینامیکی را اندازه‌گیری می‌کند که نشان‌دهنده اندازه ذره به همراه لایه هیدراتاسیون مرتبط با آن در حلال است (Eskandari et al., 2025). PDI نمونه پروتئین ایزوله خلر 0.23 ± 0.12 ، نمونه پروتئین ایزوله خلر حرارت‌دیده 0.37 ± 0.12 ، نمونه پروتئین ایزوله خلر حرارت‌دیده با صمغ زانتان 0.32 ± 0.68 ، نمونه پروتئین ایزوله خلر حرارت‌دیده با ریزدره 0.18 ± 0.08 ، نمونه پروتئین ایزوله خلر حرارت‌دیده با ریزدره، صمغ زانتان 0.07 ± 0.02 محاسبه شد. $PDI < 0.3$ توزیع

یکنواخت و متوسط در نمونه‌های پروتئین ایزوله خلر (نمونه ۱)، پروتئین ایزوله خلر حرارت‌دیده با ریزذره (نمونه ۴) و پروتئین ایزوله خلر حرارت‌دیده با ریزذره و صمغ زانتان (نمونه ۵) را نشان می‌دهد. PDI تأیید می‌کند که حضور صمغ زانتان در کنار ریزذره توانسته است از پدیده بهم‌چسبندگی (Coalescence) و ناهمگنی ابعادی ذرات جلوگیری نماید. نمونه‌های ایزوله خلر حرارت‌دیده و پروتئین ایزوله خلر حرارت‌دیده با صمغ زانتان ناهمگن و بسیار ناهمگن هستند (Ahaninjan et al., 2025).



شکل ۱- اندازه ذرات با پراکندگی نور دینامیکی
پروتئین ایزوله خلر حرارت‌دیده با ریزذره، صمغ زانتان

محاسبه عدد ساتر

قطر متوسط ساتر ($d_{3,2}$) نشان‌دهنده قطر متوسط سطحی و است، در حالی که قطر متوسط دی بروکر ($d_{4,3}$) نشان‌دهنده قطر متوسط حجمی است. در سیستم‌های پراکنده یا امولسیون‌ها، $d_{3,2}$ پایین‌تر عموماً با افزایش پایداری مرتبط است. نسبت $d_{4,3}$ به $d_{3,2}$ نشان‌دهنده یکنواختی است (Ellis & Jacquier, 2009). مقادیر میانگین قطر ذرات، $d_{3,2}$ و $d_{4,3}$ و یکنواختی اندازه ذرات در جدول ۷ ارائه شده است. نمونه ۱ بالاترین مقادیر $d_{3,2}$ ($259/92 \mu\text{m}$) و $d_{4,3}$ ($292/90 \mu\text{m}$) را داشت، به این معنی که ذرات بزرگتر و متراکم‌تر هستند. ذرات بزرگ به طور بالقوه برای کاربردهایی مانند ایجاد بافت نامناسب‌اند. مقادیر $d_{3,2}$ ($151/50 \mu\text{m}$) و $d_{4,3}$ ($208/52 \mu\text{m}$) در نمونه ۲ در مقایسه با نمونه قبلی کاهش یافته است. که نشان‌دهنده اثر حرارت بر کاهش اندازه ذرات است. افزودن صمغ زانتان برای تشکیل نمونه ۳ منجر به ساختارهای کوچکتر و کاهش $d_{3,2}$ ($114/32 \mu\text{m}$) و $d_{4,3}$ ($192/00 \mu\text{m}$) در مقایسه با نمونه ۱ و نمونه ۲ شد. احتمالاً به دلیل تعامل ناکافی بین پروتئین تخریب‌شده با حرارت و صمغ زانتان، یکنواختی اندازه ذرات ($1/61$) بالاترین مقدار را نشان داد. یعنی ذرات آن بیشترین ناهمگنی را دارند. بنابراین صمغ زانتان نتوانست به طور کامل از تجمع پروتئین تخریب‌شده با حرارت جلوگیری کند. در نمونه ۴، مقادیر پایین‌تر $d_{3,2}$ ($8/75 \mu\text{m}$) و $d_{4,3}$ ($10/36 \mu\text{m}$) و یکنواختی اندازه ذرات ($1/18$) نیز مشاهده شد که نشان می‌دهد ریزذره‌سازی بیشترین تأثیر را در کاهش قطر سطح و حجم و همچنین یکنواختی ذرات داشته است. نمونه ۵ کوچکترین $d_{3,2}$ ($5/91 \mu\text{m}$) و $d_{4,3}$ ($6/36 \mu\text{m}$) را نشان داد که نشان‌دهنده ذراتی با کوچکترین قطر در سطح و حجم است. همچنین در مقایسه با سایرین، یکنواختی اندازه ذرات ($1/06$) کمترین مقدار را نشان داد که نمایانگر ذرات یکنواخت‌تر است، که می‌تواند به دلیل اثر ترکیبی بین ریزذرات، صمغ زانتان (پلی‌ساکارید) در کنترل ابعاد ذرات باشد.

Amagliani et al. (۲۰۲۰)، مشاهده کردند که پس از عملیات حرارتی، قطر متوسط وزنی حجمی $d_{4,3}$ ایزوله‌های پروتئین به طور قابل توجهی افزایش یافت. این افزایش قابل توجه در اندازه ذرات، نشان‌دهنده درجه بالایی از تجمع پروتئین است. Chu et al. (۲۰۲۲)،

ذرات میکروژل پروتئین آب پنیر کروی را با استفاده از روشی مشابه اندازه‌گیری کردند و مقادیر $d_{۳,۲}$ و $d_{۴,۳}$ قابل مقایسه‌ای را به دست آوردند که با یافته‌های ما سازگار بود.

جدول ۷- اندازه قطر ذرات

نمونه	قطر میانگین (μm)	$d_{۳,۲}$ (μm)	$d_{۴,۳}$ (μm)	(DPI) (μm) ^۱
نمونه ۱	217.5 ± 5.1^a	259.9 ± 6.7^a	292.9 ± 7.9^a	170.1 ± 1.0^a
نمونه ۲	176.4 ± 3.1^b	157.5 ± 5.7^b	208.2 ± 6.7^a	173.3 ± 1.7^a
نمونه ۳	159.0 ± 4.9^d	114.3 ± 5.4^b	192.3 ± 6.6^a	161.1 ± 4.5^a
نمونه ۴	69.6 ± 6.5^c	87.5 ± 5.6^c	104.6 ± 1.2^b	181.1 ± 0.3^a
نمونه ۵	60.1 ± 0.5^d	59.1 ± 1.5^c	64.6 ± 1.1^b	106.6 ± 0.1^a

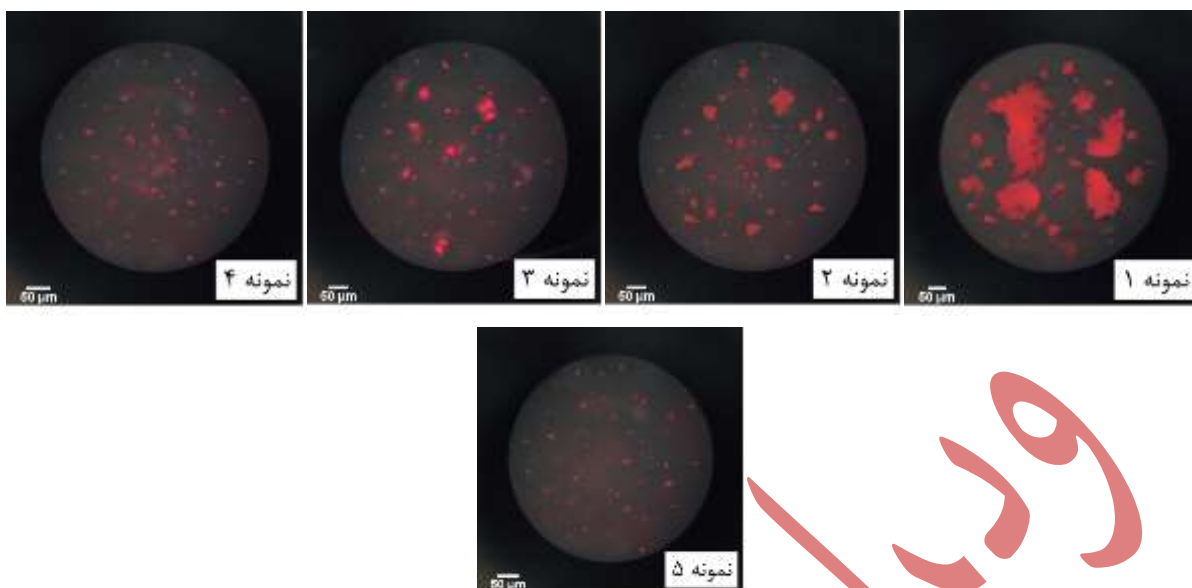
داده‌ها نشان‌دهنده میانگین $\pm$ تکرار $\pm$ انحراف استاندارد است. حروف مختلف تفاوت معنی‌داری ($p < 0.05$) بین گروه‌ها در ستون یکسان را نشان می‌دهند. نمونه ۱ (پروتئین ایزوله خالص)، نمونه ۲ (پروتئین ایزوله خالص حرارت‌دیده)، نمونه ۳ (پروتئین ایزوله خالص حرارت‌دیده با صمغ زانتان)، نمونه ۴ (پروتئین ایزوله خالص حرارت‌دیده با ریزدره)، نمونه ۵ (پروتئین ایزوله خالص حرارت‌دیده با ریزدره، صمغ زانتان)، عدد سائر $d_{۳,۲}$ ، عدد در بروکر $d_{۴,۳}$ ، نسبت قطر ذرات (DPI)

میکروسکوپ فلورسانس

تصاویر میکروسکوپ فلورسانس در شکل ۵ ارائه شده است. همانطور که در تصاویر مشاهده می‌شود، اندازه ذرات نمونه ۱ نسبت به سایر نمونه‌ها بسیار بزرگ است. در نمونه ۲ اندازه ذرات در اثر حرارت کاهش یافته ولی در اثر تجمع آنها، ذرات با اندازه‌های بسیار بزرگ دیده می‌شود. در نمونه ۳ غیر یکنواخت بودن اندازه ذرات کاملاً مشهود است. ریزذرات در نمونه ۴ دچار کمی تجمع شده‌اند که می‌تواند ناشی از احتمال برخورد بالاتر ذرات در اثر تنش برشی باشد. این نتیجه در تحقیق Wolz et al. (۲۰۱۶) نیز نشان داده شده است. در نمونه ۵ مشاهده می‌شود که ذرات همگن هستند و اندازه آنها کاهش یافته است. حرارت باعث کاهش اندازه ذرات پروتئین شده و وجود صمغ زانتان این احتمال را افزایش می‌دهد که بین ذرات قرار می‌گیرد و مانع تجمع آنها می‌شود که ممکن است به علت فعل و انفعالات آبریز پروتئینی باشد. طبق تحقیقات انجام شده، صمغ زانتان با برهمکنش الکترواستاتیک با پروتئین ایجاد کمپلکس پیچیده پروتئین-پلی‌ساکارید پایدار می‌کند (Webb et al., 2023a). تحقیق Dissanayake and Vasiljevic (۲۰۰۹)، همچنین Monroy-Rodríguez et al. (۲۰۲۱)، نشان داد حرارت کمک به کاهش اندازه ذرات پروتئین از ۱۰ میکرومتر به ۱ میکرومتر کرده است در عین حال سبب تجمع مجدد ذرات نیز شده است که با نتایج ما مطابقت دارد. Van Dijk et al. (۲۰۱۵)، حرارت را سبب افزایش فعل و انفعالات آبریز پروتئینی دانستند. به گفته Wolz et al. (۲۰۱۶)، حرارت نباید زیاد افزایش یابد زیرا بر خواص فیزیکوشیمیایی محصول تأثیرگذار است.

حرارت دادن ایزوله پروتئین خلر احتمالاً سبب باز شدن زنجیره پروتئین و کوچک شدن ذرات شد. اما این ذرات به دلیل برهمکنش‌هایی، موجب ایجاد بافت غیر یکنواخت شدند. زمانیکه صمغ زانتان به پروتئین حرارت دیده افزوده شد، احتمالاً بین ذرات کوچک شده پروتئین قرار گرفت، هرچند نتوانست به خوبی مانع تجمع ذرات شود. همگن‌سازی با توراکس، تجمعات پروتئینی ناشی از حرارت را از بین برده و ممکن است برهمکنش بین ایزوله خلر و صمغ زانتان را تسهیل کرده باشد که منجر به تشکیل کمپلکس‌های پیچیده شده باشد. به این معنی که صمغ زانتان سبب افزایش یکنواختی بافت در نمونه تولیدی گردید (Webb et al., 2023a).

^۱Diameter Particle Index (DPI)



شکل ۵- میکروسکوپ فلورسانس (×۴۰)

نمونه ۱ (پروتئین ایزوله خلر)، نمونه ۲ (پروتئین ایزوله خلر حرارت دیده)، نمونه ۳ (پروتئین ایزوله خلر حرارت دیده با صمغ زانتان)، نمونه ۴ (پروتئین ایزوله خلر حرارت دیده با ریزذره)، نمونه ۵ (پروتئین ایزوله خلر حرارت دیده با ریزذره، صمغ زانتان)

گروه سولفیدریل آزاد (SH_F) و گروه سولفیدریل پیوندی (SS)

در جدول ۸ مقدار سولفیدریل آزاد (SH_F)، سولفیدریل پیوندی (SS) و پیوند سولفیدی کل (SH_T) در نمونه‌ها آورده شده است. اختلاف معنی‌داری در مقدار SH_T نمونه‌ها وجود داشت با این حال در آزمون‌های SH_T و SS شاهد روند افزایشی از نمونه ۱ به ۵ بودیم. مقدار SH_T ($\mu M/g$ ۹۷/۸۴) و SS ($\mu M/g$ ۴۳/۸۴) در نمونه ۵ از همه بیشتر و SH_F ($\mu M/g$ ۵/۲۴) آن از همه کمتر بود. این به این معنا است که گروه سولفیدریل پیوندی می‌تواند از عوامل پایداری نمونه باشد. پپتیدها به صورت کووالانسی توسط پیوندهای دی‌سولفیدی به هم متصل می‌شوند و پلی‌پپتیدها را به وجود می‌آورند (Liu et al., 2018). وجود SS می‌تواند ساختار پروتئین را تثبیت کند (Guo et al., 2018). در تحقیق Cai et al (۲۰۲۰)، محتوای بالای SS نشان از ایجاد پیوند متقابل و تجمع راحت پروتئین بود که در نمونه ۲ نیز این تجمع دیده شد. در تحقیق Sun et al (۲۰۱۵)، مقدار SH_F در کنسانتره آب پنیر بعد از کاهش اندازه ذرات به مقدار پایین‌تری رسید. همچنین مقدار SS کنسانتره آب پنیر بعد از کاهش اندازه ذرات افزایش یافت در تحقیق Kelany et al (۲۰۲۴)، بر روی پروتئین هسته خرما پس از همگن‌سازی افزایش محتوای سولفیدریل کل نشان داده شده است. این تحقیقات نتایج به دست آمده در تحقیق ما را تأیید می‌کند.

جدول ۸- مقدار گروه سولفیدریل کل و آزاد (SH) و گروه سولفیدریل پیوندی (SS)

نمونه	محتوای SH _F (μM/g)	محتوای SH _T (μM/g)	محتوای SS (μM/g)
نمونه ۱	۲۱/۷۱ ± ۰/۲۱ ^a	۹۷/۲۶ ± ۰/۲۹ ^e	۳۵/۷۲ ± ۰/۰۷ ^e
نمونه ۲	۱۹/۴۱ ± ۰/۱۳ ^b	۹۷/۳۱ ± ۰/۱۶ ^d	۳۶/۲۴ ± ۰/۰۳ ^d
نمونه ۳	۷/۶۸ ± ۰/۰۳ ^c	۹۷/۴۶ ± ۰/۰۵ ^c	۳۹/۴۱ ± ۰/۱۵ ^c
نمونه ۴	۵/۴۸ ± ۰/۰۷ ^d	۹۷/۶۳ ± ۰/۱۷ ^b	۴۱/۵۱ ± ۰/۱۴ ^b
نمونه ۵	۵/۲۴ ± ۰/۰۵ ^e	۹۷/۸۴ ± ۰/۰۴ ^a	۴۳/۸۴ ± ۰/۱۳ ^a

داده‌ها نشان‌دهنده میانگین ۳ تکرار ± انحراف استاندارد است. حروف مختلف تفاوت معنی‌داری ($p < 0.05$) بین گروه‌ها در ستون یکسان را نشان می‌دهند. نمونه ۱ (پروتئین ایزوله خلر)، نمونه ۲ (پروتئین ایزوله خلر حرارت‌دیده)، نمونه ۳ (پروتئین ایزوله خلر حرارت‌دیده با صمغ زانتان)، نمونه ۴ (پروتئین ایزوله خلر حرارت‌دیده با ریزره)، نمونه ۵ (پروتئین ایزوله خلر حرارت‌دیده با ریزره، صمغ زانتان)، سولفیدریل آزاد (SH_F)، پیوند سولفیدی کل (SH_T) و سولفیدریل پیوندی (SS)

نتیجه‌گیری

یافته‌های این پژوهش نشان داد که فرآیند استخراج قلیایی روشی کارآمد جهت استحصال ایزوله پروتئینی با خلوص بالا ۹۱/۲۷ درصد از آرد خلر (۳۰/۴۵٪ پروتئین، ۳/۶۹٪ چربی، ۹/۹۲٪ رطوبت، ۱۸/۰۲٪ فیبر و ۸/۷۱٪ خاکستر) است که می‌تواند به عنوان یک ماده اولیه عملکردی در فرمولاسیون‌های غذایی مورد استفاده قرار گیرد. اگرچه تیمار حرارتی به دلیل فرآیند دناتوراسیون، پتانسیل بالایی در ایجاد تجمع (ماکرو-آگلوتیناسیون) ناخواسته و ناپایداری بافتی دارد، اما بکارگیری تکنیک ریزره‌سازی برشی (توسط التراتوراکس با دور ۱۰۰۰۰ rpm) به همراه صمغ زانتان به طور مؤثری این محدودیت ساختاری را برطرف کرد و اندازه ذرات را تا ۶ میکرومتر کاهش داد (آزمون DLS). این اثر ترکیبی احتمالاً از طریق ایجاد کمپلکس‌هایی میان پروتئین و پلی‌ساکارید، مانع از تجمع مجدد توده‌های پروتئینی شده و بهبود معنی‌داری را در شاخص‌های پایداری امولسیون، حالیت و ظرفیت نگهداری آب (WHC) ۹۸/۴۹ درصد و روغن (OHC) ۹۶/۷۷ درصد و ظرفیت جذب آب (WAO) ۳/۰۰ g/g و ظرفیت روغن (OAC) ۲/۷۳ g/g ایجاد کرد. علاوه بر این، کاهش کمترین غلظت تشکیل ژل به ۸ درصد، شرایط را برای بهینه‌سازی شبکه ماکرومولکولی سه‌بعدی بهبود بخشید. از سوی دیگر، کاهش ظرفیت کف‌کنندگی و پایداری آن سبب تسهیل فرآیند هم‌زدن و کاهش مشکلات عملیاتی در تولید فرآورده‌ها می‌شود. نتایج حاصل از ارزیابی مشاهدات میکروسکوپ، PDI (۰/۰۷ μm) و نتایج عدد ساتر (۵/۹۱ μm)، DPI (۱/۰۶ μm) تشکیل ریزذرات کروی، همگن و پایدار را در پروتئین ایزوله خلر حرارت‌دیده با ریزره و صمغ زانتان تأیید کردند. ارزیابی پیوندهای دی‌سولفیدی نیز نشان داد که پیوند عرضی کووالانسی دی‌سولفید (S-S) نیروی محرکه اصلی در تثبیت ساختار و پایداری این ماتریس می‌تواند باشد. خواص عملکردی بهبود یافته (مانند امولسیون‌سازی، ظرفیت نگهداری آب و پایداری رئولوژیکی) نشان می‌دهد که تیمارهای مورد بررسی پتانسیل مناسبی را به عنوان عوامل بافت‌دهنده و امولسیون‌کننده در فرمولاسیون‌های غذایی، محصولات با برچسب پاک (Clean-label) و ماتریس‌های غذایی مختلف، از جمله سیستم‌های پروتئینی مثل لبنیات و آنالوگ‌های گوشت را دارند. همچنین انجام مطالعات بیشتر برای بهینه‌سازی ویژگی‌های بافتی خاص (مانند ساختار رشته‌ای در گوشت در مقابل شبکه میسلی در پنیر) برای هر کاربرد ضروری و مستلزم تولید محصول نهایی و انجام آزمون‌های حسی، بافت‌سنجی (TPA) و رئولوژیکی در پژوهش‌های آتی خواهد بود.

قربانیان، فاطمه، کوچکی، آرش، میلانی، الناز، و رضوی، سیدمحمدعلی. (۱۳۹۵). اثر صمغ گزانتان بر خصوصیات فیزیکیوشیمیایی امولسیون روغن در آب تثبیت شده با ایزوله پروتئین خمر. علوم و صنایع غذایی ایران، ۱۳(۵۵)، ۱۱۵-۱۲۳. SID. <https://sid.ir/paper/71895/fa>

REFERENCES

- Achouri, A., Nail, V., & Boye, J. I. (2012). Sesame protein isolate: Fractionation, secondary structure and functional properties. *Food Research International*, 46(1), 360-369. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.01.001>
- Ahaninjan, M., Peighambaroust, S. H., & Azadmard-Damirchi, S. (2025). From plant to nanomaterial: Physicochemical and functional characterization of nanochitosomes loaded with antioxidant peptide fractions from oleaster-seed protein. *Journal of Agriculture and Food Research*, 20, 101771. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jafr.2025.101771>
- Ahern, T. J., & Klivanov, A. M. (1985). The mechanism of irreversible enzyme inactivation at 100 C. *Science*, 228(4705), 1280-1284. <https://doi.org/https://doi.org/10.1126/science.4001942>
- Ahmad, Y., & Nain, V. (2020). A convenient and robust protocol for preparation of ODAP-free Lathyrus sativus protein. *Analytical biochemistry*, 591, 113544. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.113544>
- Alehosseini, E., McSweeney, P. L., & Miao, S. (2025). Recent updates on plant protein-based dairy cheese alternatives: outlook and challenges. *Critical reviews in food science and nutrition*, 1-15. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/10408398.2025.2452356>
- Amagliani, L., Sassi, E. B., Buczowski, J., & Schmitt, C. (2020). Influence of protein source on the morphology, physicochemical and flow properties of protein-based emulsion particles to be used as texture modulators. *Food Hydrocolloids*, 101, 105581. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105581>
- AOAC. (2000). *Official methods of analysis of AOAC International* (Vol. 17). AOAC international.
- Arteaga, V. G., Guardia, M. A., Muranyi, I., Eisner, P., & Schweiggert-Weisz, U. (2020). Effect of enzymatic hydrolysis on molecular weight distribution, techno-functional properties and sensory perception of pea protein isolates. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 65, 102449. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102449>
- Bascuas, S., Morell, P., Hernando, I., & Quiles, A. (2021). Recent trends in oil structuring using hydrocolloids. *Food Hydrocolloids*, 118, 106612. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106612>
- Boukid, F., Rosell, C. M., & Castellari, M. (2021). Pea protein ingredients: A mainstream ingredient to (re) formulate innovative foods and beverages. *Trends in Food Science & Technology*, 110, 729-742. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.040>
- Cai, Y., Huang, L., Tao, X., Su, J., Chen, B., Zhao, M., Zhao, Q., & Van der Meeren, P. (2020). Adjustment of the structural and functional properties of okara protein by acid precipitation. *Food Bioscience*, 37, 100677. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100677>
- Cao, J., Tong, X., Wang, M., Tian, T., Yang, S., Sun, M., Lyu, B., Cao, X., Wang, H., & Jiang, L. (2022). Soy protein isolate/sodium alginate microparticles under different pH conditions: Formation mechanism and physicochemical properties. *Foods*, 11(6), 790. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/foods11060790>
- Chu, Y., Jo, Y., & Chen, L. (2022). Size-controllable core/shell whey protein microgels with narrow particle size distribution fabricated by a facile method. *Food Hydrocolloids*, 124, 107316. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107316>
- Dissanayake, M., & Vasiljevic, T. (2009). Functional properties of whey proteins affected by heat treatment and hydrodynamic high-pressure shearing. *Journal of dairy science*, 92(4), 1387-1397. <https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.2008-1791>

- Ellis, A., & Jacquier, J. (2009). Manufacture and characterisation of agarose microparticles. *Journal of Food Engineering*, 90(2), 141-145. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.05.036>
- Eskandari, B., Peighambaroust, S. H & ,Sarabandi, K. (2025). Effect of plant protein emulsifiers and carriers on the physicochemical, structural, and oxidative stability of spray-dried pomegranate seed oil emulsions. *Scientific Reports*, 15(1), 23456. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41598-025-05571-3>
- Fasolin, L. H., Pereira, R., Pinheiro, A., Martins, J., Andrade, C., Ramos, O., & Vicente, A. (2019). Emergent food proteins–Towards sustainability, health and innovation. *Food Research International*, 125, 108586. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108586>
- Feyzi, S., Milani, E., & Golimovahed, Q. A. (2018). Grass pea (*Lathyrus sativus* L.) protein isolate: The effect of extraction optimization and drying methods on the structure and functional properties. *Food Hydrocolloids*, 74, 187-196. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.07.031>
- Frigerio, M., Leser, M. E., & Salentinig, S. (2026). Beyond the oil–water interface: Cooperative alkali–lipase catalysis induces pH-responsive self-assembly in triolein hydrolysis. *Journal of Colloid and Interface Science*, 706, 139561. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcis.2025.139561>
- Garbowska, M., Berthold-Pluta, A., Stasiak-Różańska, L., Kalisz, S., & Pluta, A. (2023). The Impact of White Mulberry, Green Barley, Chia Seeds, and Spirulina on Physicochemical Characteristics, Texture, and Sensory Quality of Processed Cheeses. *Foods*, 12(15), 2862. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/foods12152862>
- Ghorban, Fatemeh, Kouchaki, Arash, Milani, Elnaz, and Razavi, Seyyed Mohammad Ali. (2016). The effect of xanthan gum on the physicochemical properties of oil-in-water emulsion stabilized with whey protein isolate. *Iranian Food Science and Technology*, 13(55), 115-123. SID. <https://sid.ir/paper/71895/fa>
- Guo, X., Sun, X., Zhang, Y., Wang, R., & Yan, X. (2018). Interactions between soy protein hydrolyzates and wheat proteins in noodle making dough. *Food Chemistry*, 245, 500-507. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.126>
- Hu, Y., Du, L., Sun, Y., Zhou, C., & Pan, D. (2023). Recent developments in phosphorylation modification on food proteins: Structure characterization, site identification and function. *Food Hydrocolloids*, 137, 108390. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108390>
- Hussien, H., El-Adly, N. A., Shams, O. S., & Mohamed, E. (2020). Production of high nutritional value gluten free crackers with sesame and turmeric powder. *Egyptian Journal of Food Science*, 48(2), 291-302. <https://doi.org/https://doi.org/10.21608/ejfs.2020.21731.1045>
- Karaca, A. C., Low, N., & Nickerson, M. (2011). Emulsifying properties of chickpea, faba bean, lentil and pea proteins produced by isoelectric precipitation and salt extraction. *Food Research International*, 44(9), 2742-2750. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.012>
- Kelany, M. A., Rashwan, A. K., Kabil, D. I., Abdelshafy, A. M., Osman, A. I., El-Seedi, H. R., & Yemis, O. (2024). Effect of high-pressure homogenization optimized by response surface methodology on the techno-functional properties of protein concentrate isolated from date seed. *Industrial Crops and Products*, 222, 119481. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.119481>
- Khan, A., Wang, C., Sun, X., Killpartrick, A., & Guo, M. (2019). Preparation and characterization of whey protein isolate–DIM nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(16), 3917. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ijms20163917>
- Leon, A., Medina, W., Park, D., & Aguilera, J. (2016). Mechanical properties of whey protein/Na alginate gel microparticles. *Journal of Food Engineering*, 188, 1-7. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.05.005>
- Liu, R., Wang, L., Liu, Y., Wu, T., & Zhang, M. (2018). Fabricating soy protein hydrolysate/xanthan gum as fat replacer in ice cream by combined enzymatic and heat-shearing treatment. *Food Hydrocolloids*, 81, 39-47. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.01.031>
- Liu, Z., Chen, X., Ruan, M., Liao, Y., Wang, Z., Zeng, Y., Li, H., Hu, L., & Mo, H. (2025). 3D printed dysphagia diet using pea protein gel modified by xanthan gum with different pyruvate group

- content. *Food Chemistry*, X, 25, 102121. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fochx.2024.102121>
- Ma, M., Ren, Y., Xie, W., Zhou, D., Tang, S., Kuang, M., Wang, Y., & Du, S.-k. (2018). Physicochemical and functional properties of protein isolate obtained from cottonseed meal. *Food Chemistry*, 240, 856-862. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.030>
- Matalanis, A., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2012). Inhibition of lipid oxidation by encapsulation of emulsion droplets within hydrogel microspheres. *Food Chemistry*, 132(2), 766-772. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.034>
- McClements, D. J., & Grossmann, L. (2021). The science of plant-based foods: Constructing next-generation meat, fish, milk, and egg analogs. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(4), 4049-4100. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1541-4337.12771>
- Mehr, H. M., & Koocheki, A. (2020). Effect of atmospheric cold plasma on structure, interfacial and emulsifying properties of Grass pea (*Lathyrus sativus* L.) protein isolate. *Food Hydrocolloids*, 106, 105899. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105899>
- Mession, J.-L., Chihi, M. L., Sok, N., & Saurel, R. (2015). Effect of globular pea proteins fractionation on their heat-induced aggregation and acid cold-set gelation. *Food Hydrocolloids*, 46, 233-243. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.11.025>
- Mohd Shukri, A., Alias, A. K., Murad, M., Yen, K. S., & Cheng, L. H. (2022). A review of natural cheese and imitation cheese. *Journal of Food Processing and Preservation*, 46(1), e16112. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jfpp.16112>
- Monroy-Rodríguez, I., Gutiérrez-López, G., Hernández-Sánchez, H., López-Hernández, R., Mazón, M. C., Dorantes-Álvarez, L., & Alamilla-Beltrán, L. (2021). Surface roughness and textural image analysis, particle size and stability of microparticles obtained by microfluidization of soy protein isolate aggregates suspensions. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 20(2), 787-805. <https://doi.org/https://doi.org/10.24275/rmiq/Alim2311>
- Morr, C., German, B., Kinsella, J., Regenstein, J., Buren, J. V., Kilara, A., Lewis, B., & Mangino, M. (1985). A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. *Journal of food science*, 50(6), 1715-1718. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1985.tb10572.x>
- Mozafarpour, R., Koocheki, A., & Nicolai, T. (2022). Modification of grass pea protein isolate (*Lathyrus sativus* L.) using high intensity ultrasound treatment: Structure and functional properties. *Food Research International*, 158, 111520. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111520>
- Pastor-Cavada, E., Juan, R., Pastor, J. E., Alaiz, M., & Vioque, J. (2010). Protein isolates from two Mediterranean legumes: *Lathyrus clymenum* and *Lathyrus annuus*. Chemical composition, functional properties and protein characterisation. *Food Chemistry*, 122(3), 533-538. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.002>
- Saatchi, A., Kiani, H., & Labbafi, M. (2019). A new functional protein-polysaccharide conjugate based on protein concentrate from sesame processing by-products: Functional and physico-chemical properties. *International journal of biological macromolecules*, 122, 659-666. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.122>
- Schlegel, K., Sontheimer, K., Hickisch, A., Wani, A. A., Eisner, P., & Schweiggert-Weisz, U. (2019). Enzymatic hydrolysis of lupin protein isolates—Changes in the molecular weight distribution, technofunctional characteristics, and sensory attributes. *Food science & nutrition*, 7(8), 2747-2759. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/fsn3.1139>
- Shen, L., & Tang, C.-H. (2012). Microfluidization as a potential technique to modify surface properties of soy protein isolate. *Food Research International*, 48(1), 108-118. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.03.006>
- Silva, L., Sato, A., & Perrechil, F. (2025). Non-spherical microparticles from complex coacervation of rice or pea proteins and chia mucilage. *International journal of biological macromolecules*, 141025. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.141025>

- Sun, C., Liu, R., Wu, T., Liang, B., Shi, C., & Zhang, M. (2015). Effect of superfine grinding on the structural and physicochemical properties of whey protein and applications for microparticulated proteins. *Food Science and Biotechnology*, 24, 1637-1643. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodsci.2015.06.012>
- Tan, M., Nawaz, M. A., & Buckow, R. (2023). Functional and food application of plant proteins—a review. *Food Reviews International*, 39(5), 2428-2456. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/87559129.2021.1955918>
- Tang, Q., Roos, Y. H & ,Miao, S. (2024). Comparative studies of structural and thermal gelation behaviours of soy, lentil and whey protein: A pH-dependency evaluation. *Food Hydrocolloids*, 146, 109240. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109240>
- Tanger, C., Schmidt, F., Utz, F., Kreissl, J., Dawid, C., & Kulozik, U. (2021). Pea protein microparticulation using extrusion cooking: Influence of extrusion parameters and drying on microparticle characteristics and sensory by application in a model milk dessert. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 74, 102851. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102851>
- Timilsena, Y. P., Adhikari, R., Barrow, C. J., & Adhikari, B. (2016). Physicochemical and functional properties of protein isolate produced from Australian chia seeds. *Food Chemistry*, 212, 648-656. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.017>
- Traynham, T., Myers, D. J., Carriquiry, A., & Johnson, L. (2007). Evaluation of water-holding capacity for wheat–soy flour blends. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 84(2), 151. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11746-006-1018-0>
- Van Dijk, E., Hoogeveen, A., & Abeln, S. (2015). The hydrophobic temperature dependence of amino acids directly calculated from protein structures. *PLoS computational biology*, 11(5), e1004277. <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004277>
- Vélez-Erazo, E. M., Bosqui, K., Rabelo, R. S., & Hubinger, M. D. (2021). Effect of pH and pea protein: xanthan gum ratio on emulsions with high oil content and high internal phase emulsion formation. *Molecules*, 26(18), 5646. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/molecules26185646>
- Wang, M., Zhou, Y., Fan, L., & Li, J. (2024). Interfacial adsorption of soybean phosphatidylethanolamine in different oil phase and the stability of water-in-oil emulsion. *Food Chemistry*, 439, 138144. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.138144>
- Webb, D., Dogan, H., Li, Y., & Alavi, S. (2023a). Physico-chemical properties and texturization of pea, wheat and soy proteins using extrusion and their application in plant-based meat. *Foods*, 12(8), 1586. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/foods12081586>
- Webb, D., Dogan, H., Li, Y., & Alavi, S. (2023b). Use of legume flours and fiber for tailoring structure and texture of pea protein-based extruded meat alternatives. *Journal of food science*, 88(1), 57-71. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1750-3841.16397>
- Webb, D., Plattner, B. J., Donald, E., Funk, D., Plattner, B. S., & Alavi, S. (2020). Role of chickpea flour in texturization of extruded pea protein. *Journal of food science*, 85(12), 4180-4187. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1750-3841.15531>
- Wolz, M., Kastenhuber, S., & Kulozik, U. (2016). High moisture extrusion for microparticulation of whey proteins—Influence of process parameters. *Journal of Food Engineering*, 185, 56-61. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.04.002>
- Wu, L., Jiang, Y., Chen, C., Zhang, W., Guo, J., Liu, S., Wang, P., Ren, F., Xu, B & ,Hu, Y. (2025). Efficient stabilizing effect of low-dose zein/xanthan gum nanoparticles at the oil-water interface. *International journal of biological macromolecules*, 294, 139512. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.139512>
- Youshanlouei, Y. A., Kiani, H., Mousavi, M., & Mousavi, Z. E. (2022). Grass pea (*Lathyrus sativus* L.) protein yield and functionality as affected by extraction method: Alkaline, ultrasound-assisted, and ultrasound pretreatment extraction. *Cereal Chemistry*, 99(4), 946-951. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cche.10549>
- Youshanlouei, Y. A., Kiani, H., Mousavi, M., Mousavi, Z. E., Tao, Y., & Halim, R. (2024). Persian everlasting pea (*Lathyrus rotundifolius* L.) protein isolate as a potential protein source for food

application: Effect of ultrasound-assisted extraction method on the properties of the protein isolates. *Journal of Food Process Engineering*, 47(1), e14533. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jfpe.14533>

Zayas, J. F. (2012). *Functionality of proteins in food*. Springer science & business media .

Zhang, S., Holmes, M., Ettelaie, R., & Sarkar, A. (2020). Pea protein microgel particles as Pickering stabilisers of oil-in-water emulsions: Responsiveness to pH and ionic strength. *Food Hydrocolloids*, 102, 1 . <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105583>

Zhang, Y., & Romero, H. M. (2020). Exploring the structure-function relationship of Great Northern and navy bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein hydrolysates: A study on the effect of enzymatic hydrolysis. *International journal of biological macromolecules*, 162, 1516-1525. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.019>

پژوهشهای زیست‌شناسی