

REVIEW INTERAKSI PROTEIN WHEY DAN POLIFENOL

Abdul Manab*¹, Premy Puspita Rahayu¹ dan Winda Fransisca Saragih^{1,2}

¹ Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya

² Mahasiswa Pasca Sarjana, Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya

*Korespondensi email: manabfpt@ub.ac.id

Abstrak. Sifat functional dan fisikokimia protein whey dan senyawa polifenol dari tanaman khususnya teh hijau and kako menjadi perhatian para peneliti. Protein whey memiliki interaksi yang kuat dengan senyawa polifenol dan membentuk kompleks yang kuat sehingga berpengaruh ke sifat kelarutan, bioavaibilitas dan stabilitasnya terhadap panas. Tujuan penulisan review ini untuk mendeskripsikan mekanisme interaksi antara protein whey dengan polifenol yang perlu dideskripsikan untuk memahami pengaruhnya terhadap sifat fungsional kompleks protein whey dan polifenol. Interaksi nonkovalen antara protein whey dan polifenol diinvestigasi menggunakan spektroskop dan molecular docking. Polifenol dan protein bereaksi melalui interaksi kovalen dan nonkovalen. Interaksi kovalen terjadi antara radikal atau quinon yang dihasilkan melalui oksidasi polifenol dan rantai sisi asam amino dari protein. Pada interaksi nonkovalen, polifenol umumnya terikat ke protein melalui interaksi hidrofobik, van der Waals dan ikatan hidrogen. Interaksi nonkovalen dapat memicu perubahan konformasi parsial pada struktur sekunder protein, meningkatkan kadar α -helix namun menurunkan β -sheet, random coil dan struktur lainnya, sehingga kompleks tersebut dapat meningkatkan stabilitas thermal. Secara umum, mekanisme interaksi antara komponen protein whey (α -laktalbumin, β -laktoglobulin, bovine serum albumin) dan polifenol memiliki perbedaan terkait perbedaan struktur, sehingga mempengaruhi sifat functional dan fisikokimia protein whey.

Kata kunci: protein whey, polifenol, interaksi

Abstract. Increasing attention some researchers on functional and physicochemical properties of whey protein and polyphenol substances from plant resources, especially green tea and cocoa, increase the study of whey protein and polyphenol interaction. Whey protein have strong interaction with polyphenol substances and form the strong complex that affect the solubility, stability on thermal and bioavaibility. The purpose of thir review was to describe the mechanism of whey protein and polyphenol interaction to understood the interaction on functional properties of whey protein and polyphenol. Covalent and Non-covalent interaction between whey protein and polyphenol was observed using spectroscopy and molecular docking. Reaction between whey protein and polyphenol via covalent and non-covalent interaction. Covalent interaction between radical and quinon that produced from polyphenol oxidation and side chain of amino acid from protein. On non-covalent interaction, polyphenol bind to whey protein as hydrophobic interaction, van der Waals and hydrogen bond. Non-covalent interaction induce partial conformation changes on secunder structure of protein, increase α -helix, but decrease β -sheet, random coil and other structure, thus the complex increase thermal stability. The mechanism of whey protein (α -lactalbumin, β -lactoglobulin, bovine serum albumin) and polyphenol interaction was different, due to the different of structure, thus it affect the functional and physicochemical properties of whey protein.

Keyword: whey protein, polyphenol, interaction

PENDAHULUAN

Senyawa fenol mendapatkan banyak perhatian dalam beberapa tahun terakhir, terutama sejumlah bioaktifnya, sebagai antiinflamasi, antikanker, antioksidan dan antialergi (Beara et al, 2012; Zhu et al., 2014; Abd-ElSalam et al., 2016) yang banyak ditemukan di daun teh, sayuran dan buah-buahan (Kojima et al., 2000; Harnly et al., 2007). Polifenol dari tanaman pangan meliputi asam fenolik, flavonoid, tannin dan antosianin merupakan metabolit sekunder yang banyak ditemukan di teh, apel dan anggur (Hanhineva et al., 2014; Myint et al., 2020). Selain aktifitas bioaktifitasnya, fenol juga bisa

memperbaiki sifat fungsional protein melalui interaksinya dengan protein, sehingga dapat memperbaiki kapasitas emulsi (Berton-Carabin et al., 2013; Wang et al., 2014) dan stabilitas buih (Schneider et al., 2016).

Protein whey merupakan hasil samping dari industri keju, yang banyak mengandung protein berupa α -laktalbumin, β -laktoglobulin dan bovine serum albumin (BSA) yang memiliki sifat mudah terdenaturasi oleh panas sehingga bisa mempengaruhi sifat fisikokimia dan sifat fungsionalnya. Penambahan polifenol ke protein whey diharapkan dapat menstabilkan struktur protein whey sehingga dapat menstabilkan sifat fisikokimia dan sifat fungsionalnya. Untuk mengkaji perubahan yang terjadi pada protein whey yang ditambah polifenol bisa diinvestigasi menggunakan spektrometri, yaitu FTIR dan spektrofotometer fluorescence atau menggunakan simulasi komputasi dengan molecular docking.

Polifenol

Senyawa fenol struktur kimianya berupa gugus hidroksil yang terikat ke cincin aromatik (Rodriguez et al., 2015). Senyawa fenol secara alami terdapat di tanaman sebagai metabolit sekunder. Fenol diklasifikasikan sebagai flavonoid, asam fenolik, lignan dan stilben berdasarkan gugus hidroksil, gugus karboksil dan sejumlah cincin aromatik (Naseri et al., 2018). Fenol dikarakterisasi melalui kemampuannya mengikat dan membentuk kompleks dengan protein yang berpengaruh terhadap kelarutan, bioavailabilitas dan stabilitas thermal. Interaksi hidrofobik dan ikatan hidrogen berperan penting dalam interaksi protein whey dengan fenol yang berpengaruh terhadap kelarutan koloid, agregasi dan presipitasi (Jauregi et al., 2021).

Teh (*Camellia sinensis*) banyak mengandung polifenol, utamanya katekin yang merupakan 85% polifenol yang ada di teh (Ferruzzi, 2010). Epigallocatekin-3-galat (EGCG) merupakan katekin yang paling aktif secara biologis (Kim et al., 2014). Bioavailabilitas dan stabilitas EGCG dapat diperbaiki melalui kompleksasi dengan protein. Diantara katekin teh, EGCG memiliki afinitas pengikatan paling tinggi ke protein whey terkait gugus fungsional galloyl dengan sisi pengikatan peptida multiple, dapat membentuk interaksi hidrofobik dan ikatan hidrogen dengan protein (Kanakis et al., 2011).. Interaksi EGCG dengan protein susu merupakan faktor kritis yang menentukan bioavailabilitas dan bioaktivitas EGCG.

Ekstraksi fenol dari teh hijau menggunakan microwave assisted extraction (MAE) menghasilkan fenol berkisar antara 0,37 - 0,45 (mg/g) (Rahayu et al., 2015). Ekstraksi fenol dari kulit kakao menggunakan microwave assisted extraction (MAE) menghasilkan fenol berkisar antara 6,71-8,65 mg GAE/mL serta menghasilkan katekin berkisar 47,80 – 51,03 μ g/mL (Rahayu et al., 2019). Biji kakao banyak mengandung polifenol, sekitar 10% dari berat kering biji kakao (Gallo et al., 2013)

Protein Whey

WPI utamanya tersusun atas β -laktoglobulin (75,7%) dan α -laktalbumin (14,7%) (Keppler et al., 2017). β -lg merupakan komponen utama WPI, mengandung 162 residu asam amino, berat molekul sekitar 18,4 kDa dan dapat mengikat molekul hidrofobik (Kontopidis et al., 2004). Exchange sulfhidril-

disulfida pada dimer β -laktoglobulin terjadi jika β -laktoglobulin terdisosiasi menjadi monomer sehingga 2 gugus sulfhidril (SH) terekspos. Gugus SH pada dimer β -laktoglobulin, Bahan pemblokir gugus SH dapat mempengaruhi gelasi thermal dan teksturisasi β -laktoglobulin (Hoffman MAM and Van Mil PJJM, 1997). Exchange disulfida (SH) dapat menstabilkan adsorpsi film β -laktoglobulin, dan sifat ini sangat penting bagi sifat fungsional permukaan seperti emulsifikasi dan foaming (Courthaudon et al, 1991; McClements et al., 1993). Aktifasi gugus SH dapat mempengaruhi konformasi protein, pengontrolan konformasi reaktifitas gugus SH mudah dipahami jika gugus tersebut dilindungi oleh protein alami. Gugus SH yang terekspos dapat meningkatkan efek antioksidan β -laktoglobulin terhadap oksidasi asam linoleat (Taylor and Richardson, 1980; Moller et al., 1998).

β Laktoglobulin (β lg) pada pH netral ada dalam bentuk campuran monomer dan dimer, rasio equilibriumnya tergantung pada konstanta penggabungan dimer dan kadar protein. Setiap monomer terdiri dari 162 residu asam amino dengan berat molekul 18 kDa (Qin et al., 1998). β Laktoglobulin memiliki afinitas yang kuat terhadap berbagai senyawa hidrofob dan amfifilik (Liang & Subirade, 2010). Senyawa polifenol menunjukkan interaksi yang kuat dengan protein globuler (Liang & Xu, 2003). Kompleksasi polifenol akan menstabilkan stabilitas dan konformasi protein susu (Aguie-Beghin, et al., 2008).

Salah satu karakteristik β -laktoglobulin adalah kemampuannya mengikat molekul hidrofobik dan dapat bereaksi dengan polifenol teh (Kanakis et al., 2011) dan membentuk kompleks dengan polifenol tertentu (von Staszewski et al., 2011). Denaturasi β -laktoglobulin menggunakan panas dapat membentuk nanopartikel dengan ukuran 200-300 nm. Interaksi antara protein whey dengan polifenol (resveratrol) dapat meningkatkan kelarutan dan stabilitas protein whey (Jauregi et al., 2021)

α -Laktalbumin (α -la) merupakan salah satu protein globuler yang ditemukan dalam susu sapi dan air susu ibu (ASI). α -La merupakan protein utama kedua di whey susu sapi, berkisar 20-25%. Sementara di ASI, α -la merupakan protein utama, jumlahnya sekitar 74%. α -La sapi ada dalam bentuk protein pengikat Ca^{2+} rantai tunggal, tersusun dari 123 asam amino esensial dan asam amino yang memiliki rantai bercabang. Terminal NH_2 berupa asam glutamat, sedangkan Terminal-COOH berupa leusin, tidak memiliki gugus thiol bebas dan memiliki 4 ikatan disulfida. α -La relatif kecil molekulnya dengan berat molekul sekitar 14070 di ASI dan 14178 di susu sapi, relatif banyak mengandung asam amino esensial, yaitu triptofan, lisin dan sistein (Appel et al., 1994), Titik isoelektrik pada pH 4,2-4,6 dengan kelarutan di air yang tinggi (Tolkach et al., 2005). α -La relatif stabil terhadap panas jika terikat ke Ca dibandingkan dengan protein whey lainnya dan kemungkinan terglukolisasi dengan manosa, galaktosa, fruktosa, glukosa dan laktosa. Sifat penting dari α -laktalbumin adalah kemampuannya untuk berinteraksi dengan senyawa hidrofobik seperti peptida hidrofobik, membran lipid dan asam lemak (Barbana and others 2006). Sifat ini sangat penting terkait proses pemurnian α -la (Conrado and others 2005; Tolkach and Kulozik 2005). Sifat fungsional α -la terkait dengan kandungan asam amino triptofan yang tinggi (Beulens et al., 2004).

Protein susu dapat berperan sebagai delivery vehicle untuk senyawa bioaktif, seperti polifenol, melalui interaksi nonkovalen. Senyawa fenol bisa berinteraksi dengan protein susu seperti kasein, bovine serum albumin, α -laktalbumin dan β -laktoglobulin (Ozidal et al., 2013). α -Laktalbumin dalam bentuk apo-nya memiliki kemampuan berinteraksi dengan senyawa hidrofobik seperti retinol (Livney, 2010), vitamin D3 (Delavari et al., 2015), peptida hidrofobik, asam lemak (Barbana et al., 2006; Kehoe & Brodtkorb, 2014). Protein whey memiliki sifat kelarutan yang tinggi di air, interaksi yang tinggi dengan polifenol. β -Laktoglobulin menunjukkan interaksi yang kuat dengan polifenol, membentuk nanopartikel-laktoglobulin-polifenol dengan ukuran 200-300 nm dengan sifat koloid yang stabil (Jauregi et al., 2021).

Interaksi Protein Whey-Polifenol

Polifenol seringkali bereaksi dengan komponen makanan seperti dengan protein selama pengolahan, transportasi dan penyimpanan, yang dapat mempengaruhi struktur, fungsi dan nilai gizi protein serta mempengaruhi stabilitas penyimpanan, bioavailabilitas dan pelepasan polifenol. Polifenol secara umum bereaksi dengan protein globuler dan dapat merubah struktur dan konformasi protein. Afinitas pengikatannya tergantung pada ukuran molekul polifenol; semakin besar ukuran molekul polifenol, semakin besar tendensinya membentuk kompleks dengan protein (De Freitas and Mateus, 2001).

Polifenol dan protein bereaksi melalui interaksi kovalen dan nonkovalen. Interaksi kovalen terjadi antara radikal atau quinon yang dihasilkan melalui oksidasi polifenol dan rantai sisi asam amino dari protein (Ali et al, 2018). Pada interaksi nonkovalen, polifenol umumnya terikat ke protein melalui interaksi hidrofobik, van der Waals dan ikatan hidrogen. Interaksi nonkovalen dapat memicu perubahan konformasi parsial pada struktur sekunder protein, meningkatkan kadar α helix namun menurunkan β sheet, random coil dan struktur lainnya, sehingga kompleks tersebut dapat meningkatkan stabilitas termalnya (Jia et al., 2017).

Kompleksasi nonkovalen dan konjugasi kovalen merupakan mekanisme dasar bagi komponen individu protein whey dan polifenol. Sejumlah asam amino (khususnya prolin), gugus -SH, gugus S-S, berat molekul, konformasi dan struktur digunakan sebagai dasar untuk menentukan interaksi protein whey dengan polifenol (Ranadheera, et al., 2016). Interaksi secara fisik (nonkovalen), termasuk daya elektrostatis, interaksi hidrofobik, Van der Waals dan ikatan hidrogen, terjadi secara spontan dan membentuk kompleks lemah yang bersifat reversible. Sedangkan ikatan kovalen, jarang terjadi, namun hasil pembentukan kojugat bersifat stabil dan bersifat irreversibel (Le Bourvellec and Renard, 2012; Liu et al., 2019).

Interaksi nonkovalen antara tiga protein whey: β -laktoglobulin (β -Lg), α -laktalbumin (α -La) dan bovine serum albumin (BSA) dengan polifenol (asam klorogenik) diinvestigasi menggunakan analisis spektroskopi dan molecular docking. Jumlah pengikatan untuk tiga protein tersebut dan afinitas pengikatan menurun secara berurutan: α -La > β -Lg > BSA. Parameter termodinamis menunjukkan

peran daya hidrofobik dalam tiga sistem tersebut. Pengukuran Fluorescence resonance energy transfer (FRET) mengindikasikan bahwa terjadi transfer energi diantara tiga protein dan asam klorogenik, secara berurutan α -La > BSA > β -Lg. Variasi muatan permukaan mengindikasikan adanya keterlibatan interaksi elektrostatis. Hidrofobitas permukaan berkurang secara berurutan α -La > β -Lg > BSA. Kajian modelling menyatakan bahwa sisi pengikatan yang paling memungkinkan untuk tiga protein tersebut ada pada permukaannya. Hasil docking menunjukkan bahwa ada dugaan peran interaksi hidrofobik dan ikatan hidrogen (β -Lg, α -La) untuk pembentukan kompleks nano molekuler diantara protein whey dan asam klorogenik (Zhang et al, 2021)

Pengikatan EGCG ke α -laktalbumin mengakibatkan perubahan konformasi α -laktalbumin yang menginduksi transisi α -helix ke struktur β (Al-Hanish et al., 2016). EGCG dapat berinteraksi dengan α -laktalbumin dan membentuk kompleks nonkovalen yang stabil melalui interaksi nonkovalen (Wang et al., 2014). Interaksi nonkovalen, afinitas pengikatan dan sisi pengikatan, antara α -laktalbumin dan EGCG dikaji menggunakan fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), isothermal titration calorimetry (ITC), and molecular docking simulations (Zhang et al., 2021). Ikatan kovalen EGCG ke WPI yang dimodulasi oleh pH basa dapat meningkatkan foaming protein dan sifat pengemulsi WPI (Jia et al 2016).

Ekstrak Teh hijau (GTE) banyak mengandung polifenol epigalokatekin galat (EGCG), 20-48% EGCG dalam GTE bereaksi dengan Whey Protein Isolate (WPI) (Carson et al., 2019). Untuk meningkatkan stabilitas EGCG, umumnya dikombinasikan dengan protein carrier seperti β -laktoglobulin (β LG) (Kepler et al., 2015). Komposisi katekin GTE (>95% polifenol) berupa EGCG, EGC, ECG, and EC dan utamanya EGCG (88%). Kombinasi GTE (EGCG dan ECG) dan WPI menghasilkan interaksi nonkovalen (Carson et al., 2019). EGCG dan ECG bereaksi sangat kuat dengan protein [Bohin et al.,2012), terkait sifat reaksi nonkovalen, katekin terikat ke protein selalu dalam equilibrium dengan katekin tak terikat (Carson et al., 2019).

Kompleks polifenol-protein yang terbentuk antara protein dengan epikatekin dan epigalokatekin lebih stabil daripada katekin. Ikatan hidrogen terbentuk antara C, EC dan ECGC dan berbagai residu asam amino yang menstabilkan kompleks polifenol-protein (Kanakis et al., 2011). Pengikatan polifenol ke β laktoglobulin meningkat dengan meningkatnya gugus OH secara berurutan EGCG > ECG > EC > C. Baik interaksi hidrofobik dan hidrofilik ditemukan dalam kompleksasi polifenol- β laktoglobulin. Pengikatan polifenol merubah struktur sekunder protein dengan meningkatnya β -sheet and α -helix, yang memicu stabilisasi struktur protein (Kanakis et al., 2011).

Secara umum, ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik merupakan dua daya nonkovalen yang membentuk interaksi protein-fenol (Jia et al., 2017), interaksi antara dua polifenol (quercetin dan polifenol teh hijau) dan α laktalbumin utamanya melalui interaksi hidrofobik (Wang and Wang, 2015; AlHanish et al., 2016). Ketika molekul polifenol berinteraksi dengan WPI, maka hidrasi hidrofobik WPI rusak, selanjutnya molekul air yang terikat lepas ke dalam medium dan menjadi molekul air bebas (Li et al., 2013)

Ikatan kovalen dan interaksi nonkovalen merupakan dua mekanisme dasar perubahan protein oleh senyawa fenol (Ozidal et al., 2013). Ikatan kovalen bersifat kuat dan bersifat irreversibel. Suhu dan pH merupakan faktor kritis yang mempengaruhi interaksi protein-fenol (Rawel et al., 2002; Shpigelman et al., 2010). Kondisi keasaman spesifik, contohnya pH alkali, dapat mempengaruhi tingkat pengikatan, pembentukan ikatan kovalen dan interaksi nonkovalen melalui induksi radikal atau quinon dari autooksidasi (Mori et al., 2007; Schwartz et al., 2008). Ikatan kovalen EGCG ke WPI yang dimodulasi alkali dapat meningkatkan foaming protein dan sifat emulsi WPI (Jia et al., 2016). Namun, suhu tinggi dan pH alkali dapat merusak stabilitas senyawa fenol (Schwartz et al., 2008). Asam galat (GA) dan EGCG interaktif dengan WPI pada pH netral dan asam dan pada suhu ruang. GA dan EGCG memodifikasi struktur protein, mengikat komponen WPI (Cao and Xiong, 2017). Suhu dan pH merupakan dua faktor kritis yang mempengaruhi interaksi protein-fenol, pada pH basa dapat mempengaruhi pengikatan, pembentukan ikatan kovalen dan interaksi nonkovalen yang diinduksi oleh radikal dan quinon dari autooksidasi (Mori et al, 2007; Schwartz et al., 2008).

Protein whey tetap terlarut selama presipitasi kasein pada pH 4,4-4,6. Jadi, penurunan kelarutan protein whey pada kisaran pH tersebut digunakan untuk menguji tingkat denaturasi protein whey. α -Laktalbumin mengalami penurunan kelarutan sampai sekitar 20% pada pH 4,4-4,6 yang mengindikasikan terjadinya denaturasi terkait modifikasi, sedangkan PPO- β laktoglobulin menunjukkan penurunan kelarutan pada kisaran pH 2 dan 5. Emulsi minyak dalam air pada sampel β laktoglobulin termodifikasi melalui penambahan QCA tidak banyak berubah (Ali et al, 2013). Sampel β laktoglobulin yang dimodifikasi dengan PPO (PPO- β laktoglobulin) memiliki sifat lebih tahan terhadap panas. Protein yang dimodifikasi dengan fenol masih dapat didegradasi dengan enzim proteolitik. Reaksi yang dimodulasi oleh PPO/CQA dapat memperbaiki stabilitas emulsi protein dan meningkatkan bioavailabilitas senyawa bioaktif (Ali et al, 2013).

Interaksi protein-polifenol menunjukkan bahwa reaktivitas utama β -laktoglobulin (β -Lg) terhadap polifenol kakao (katekin dan epikatekin). Pembentukan kompleks protein-polifenol, terutama β -Lg dan polifenol kakao, melalui ikatan kovalen gugus SH-bebas dari residu sistein bebas dari β -Lg dan melalui interaksi nonkovalen. α Laktalbumin tidak menunjukkan adanya reaktivitas dengan katekin dan epikatekin (Gallo et al., 2013).

β Laktoglobulin yang memiliki gugus hidrofob lebih banyak memiliki afinitas ke polifenol daripada α laktalbumin yang memiliki gugus hidrofob lebih sedikit, sementara β laktoglobulin memiliki sisi pengikatan yang sangat mirip ke dua polifenol (galangin dan genistein). Polifenol kemungkinan memiliki interaksi nonkovalen yang berbeda dengan protein, tergantung pada struktur polifenol dan hidrofobitas protein (Ma and Zhao, 2019). Kantong hidrofobik dari β laktoglobulin ke galangin dan genestein hanya berbeda di residu satu asam amino (lys-77 vs Gln-13). Baik galangin maupun genestein terikat ke β laktoglobulin melalui sisi pengikatan yang sangat mirip. Namun, α laktalbumin memiliki sisi pengikatan yang berbeda ke galangin dan genestein. β Laktoglobulin memiliki energi interaksi yang lebih tinggi daripada α laktalbumin jika kedua protein tersebut didocking dengan

molekul polifenol yang sama. Beberapa residu asam amino hidrofobik dalam molekul protein memberikan stabilisasi kompleks protein-polifenol, melalui interaksi hidrofobik. Interaksi hidrofobik memiliki peran penting dalam pembentukan kompleks protein-polifenol (Ma and Zhao, 2019).

Interaksi nonkovalen antara WPI dan dua polifenol (galangin dan genistein) mengakibatkan perubahan struktur sekunder, interaksi hidrofobik merupakan daya pengikat yang utama (Ma and Zhao, 2019). β Laktoglobulin memiliki afinitas yang lebih tinggi ke polifenol (galangin dan genistein) dibandingkan dengan α -laktalbumin, diduga terkait hidrofobitas, β laktoglobulin memiliki nilai hidrofobitas 5,1 kJ/residu sementara α -laktalbumin 4,7 kJ/residu (Fox and Mcsweeney, 1998). Jika lima polifenol terikat ke β laktoglobulin, menunjukkan sisi pengikatan yang berbeda (Kanakis et al., 2011; Sahihi and Ghayeb, 2014).

Baik galangin dan genistein berinteraksi secara nonkovalen dengan WPI utamanya melalui interaksi hidrofobik yang memicu perubahan konformasi sekunder protein dalam WPI. Kedua polifenol tersebut terikat sisi yang sama di β laktoglobulin namun terikat pada sisi yang berbeda di α laktalbumin (Ma and Zhao, 2019).

Molecular Docking Protein Whey-Polifenol

Pengikatan EGCG ke α -laktalbumin mengakibatkan perubahan struktur sekunder protein dengan ditandainya adanya perubahan transisi dari α ke β . Interaksi antara EGCG dengan α -laktalbumin mengakibatkan terjadinya penurunan intensitas band, yang mengindikasikan bahwa EGCG menginduksi perubahan struktur helix, kadar α -helix mengalami penurunan dari 31,7% menjadi 24,1%, β sheet meningkat dari 38,7% menjadi 46,7%. EGCG menginduksi terjadinya perubahan bentuk band amida I, yang mengindikasikan bahwa struktur sekunder α -laktalbumin mengalami perubahan selama pengikatan EGCG. (Al-Hanish et al., 2016). Pengikatan EGCG tidak merubah struktur utama protein, hanya struktur sekunder yang mengalami rearragement (Al-Hanish et al., 2016). Simulasi molecular docking mengindikasikan eksistensi sisi afinitas pengikatan EGCG yang terletak di sisi masuk antara domain yang kaya α -helix dan β -sheet (Al-Hanish et al., 2016).

Energi pengikatan untuk α -laktalbumin alami sebesar 28,4 kJ/mol dan 30,1 kJ/mol untuk α -laktalbumin rekombinan. Pengikatan EGCG ke sisi pengikatan didominasi utamanya oleh ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik. Pada struktur protein α -laktalbumin alami, ada dua gugus hidroksil dari cincin trihidroksifenil dari molekul EGCG yang membentuk ikatan hidrogen dengan backbone gugus CO dari rantai sisi Gln54 dan Trp104 (Gambar 3C). Kemungkinan juga ada interaksi O-H..... π antara gugus hidroksi ketiga dan cincin aromatik dari Tyr103. Cincin trihidroksibenzoat dari molekul EGCG dapat membentuk ikatan hidrogen dengan rantai sisi Glu49 dan Asn44 dan backbone gugus CO dari Tyr103. Atom nitrogen dari cincin imidazole dari His32 dihubungkan dengan ikatan hidrogen ke gugus hidroksi dari cincin dihidroksibenzopiran dari molekul EGCG (Al-Hanish et al., 2016).

Simulasi docking pada struktur α LA rekombinan menghasilkan perbedaan orientasi EGCG dalam sisi pengikatan yang sama. Rantai sisi EGCG dari glu49 terlibat dalam ikatan hidrogen dengan gugus

hidroksil baik dari gugus trihidroksibenzoat dan trihidroksifenil dari molekul EGCG. Rantai sisi Tyr103 dan Trp104 terikat ke gugus hidroksi trihidroksibenzoat, Gln54 ke salah satu gugus hidroksi trihidroksifenil dan His32 ke dihidrobenzopiran. Asam amino lainnya ditemukan ada di sisi pengikatan, yang berinteraksi melalui Van der Waals dengan molekul EGCG adalah Thr33, Phe53, Leu105 dan Ala106 (Al-Hanish et al., 2016).

Struktur α LA mengandung dua inti hidrofobik dalam struktur alaminya. Inti hidrofobik pertama terbentuk oleh Phe31, His32, Gln117 dan Trp118 from helix 2 dan 3/10 helix h3c (aromatic cluster I), Inti hidrofobik kedua, aromatic cluster II disebut juga sebagai “kotak hidrofobik”, terdiri dari tiga residu triptofan (Trp26, Trp60 and Trp104), diantara residu lainnya (Phe53, Gln54, dan Tyr103). EGCG terikat ke residu aromatic cluster II dari α -laktalbumin berinteraksi dengan residu Gln54, Tyr103, Trp104 dan Phe53 dari inti hidrofobik melalui ikatan hidrogen dan interaksi van der Waals. Pengikatan senyawa polifenol (resveratrol, curcumin, genistein and kaempferol) ke α -laktalbumin menunjukkan perbedaan bagian pengikatan ke α -laktalbumin. Sisi pengikatan EGCG mirip, namun tidak sama. Hasil ini menunjukkan bahwa tidak ada sisi pengikatan polifenol yang spesifik dalam α -laktalbumin. Analisis *in silico* menunjukkan bahwa α -laktalbumin mengandung paling tidak satu sisi pengikatan EGCG yang memiliki afinitas tinggi. Sisi afinitas tinggi terletak dalam kantong hidrofobik pada jalan masuk antara dua domain α -laktalbumin dan termasuk residu dari cluster II aromatik. Analisis docking menunjukkan bahwa pengikatan EGCG ke α -laktalbumin pada bagian hidrofobik pada celah masuk diantara domain yang banyak terdapat α -helix dan β -sheet. α -Laktalbumin dapat berperan sebagai sistem delivery yang sesuai bagi EGCG, dan sesuai untuk fortifikasi makanan yang mengandung senyawa bioaktif (katekin) (Al-Hanish et al., 2016).

Protein ini memiliki kantong hidrofobik yang terdiri dari 13 residu asam amino yaitu Leu-39, Val-41, Leu-58, Lys-60, Glu-62, Lys-69, Ile-71, Ile-84, Asp-85, Ala-86, Asn-88, Asn-90, and Met-107 untuk katekin atau 13 residu asam amino lainnya yaitu Pro-38, Leu-39, Val-41, Ile-56, Leu-58, Lys-60, Lys-69, Ile-71, Ile-84, Asp-85, Asn-90, Phe-105, and Met-107 untuk epikatekin (Kanakis et al., 2011). Kemungkinan protein whey memiliki sisi pengikatan nonspesifik untuk polifenol (Ma and Zhao, 2019). Interaksi antara protein dengan molekul kecil dapat menginduksi perubahan konformasi sekunder (Ma and Zhao, 2019).

Polifenol terikat ke β laktoglobulin melalui interaksi hidrofilik dan hidrofobik. Jumlah polifenol yang terikat ke permolekul protein adalah 1,1 (C), 0,9 (EC), 0,9 (ECG) dan 1,3 (EGCG). Molecular docking menunjukkan peran beberapa residu asam amino dalam kompleksasi polifenol-protein. β Laktoglobulin mengalami perubahan konformasi dengan adanya polifenol, β -sheet dan α -helix mengalami peningkatan yang bisa berakibat pada stabilisasi struktur protein (Kanakis et al., 2011).

Sifat Fisikokimia Protein Whey-Polifenol

Protein whey digunakan dalam formulasi makanan karena nilai gizi dan sifat fungsionalnya, seperti kemampuan foaming, kapasitas emulsi, sifat gel, kelarutan tinggi dan mudah dicerna (Setiowati et al.,

2020). Interaksi protein whey dengan fenol teh hijau menghasilkan stabilitas emulsi berkisar 25,90 – 31,78%, aktifitas emulsi 44,79-46,52 (m²/g) dan foaming berkisar 175-199,67% (Rahayu et al., 2015).

Pembentukan buih dipengaruhi oleh adsorpsi bahan foaming pada interface udara-air dan kemampuannya menurunkan tegangan permukaan secara cepat (von Staszewski et al., 2014). Pembentukan nanokompleks β laktoglobulin dan polifenol teh hijau dapat menurunkan tegangan permukaan dan elastisitas dilatasi permukaan film dibandingkan hanya β laktoglobulin (Rodriguez et al., 2015).

Peran polifenol untuk mencegah pecahnya rongga foam terletak pada interaksi interfacial antara protein whey dengan polifenol (Rodriguez et al., 2015). Penambahan polifenol ke protein whey dapat meningkatkan sifat foam dan emulsi, namun film interfacial menjadi mudah rusak. Sifat foam sangat dikontrol oleh sifat monolayer yang melindungi interface udara-air. Namun, tegangan permukaan tidak cukup untuk memprediksi sifat foaming, khususnya larutan protein-polifenol yang lebih kompleks dimana molekul tersebut berinteraksi satu sama lain membentuk karakteristik interfacial yang kompleks (Rodriguez et al., 2015).

DAFTAR PUSTAKA

- Abd-ElSalam HAH, Al-Ghobashy MA, Al-Shorbagy M, Nassar N, Zaazaa HE, Ibrahim MA. 2016. Correlation of *in vivo* and *in vitro* assay results for assessment of free radical scavenging activity of green tea nutraceuticals. *J Food Sci* 81:C1707–15.
- Aguié-Beghin, V., Sausse, P., Meudec, E., Cheynier, V., and Douillard, R. 2008. Polyphenol– β -casein complexes at air/water interface and in solution: Effects of polyphenol structure. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 9600–9611.
- Al-Hanish, A., D. Stanic-Vucinic, J. Mihailovic, I. Prodic, S. Minic, M. Stojadinovic, M. Radibratovic, M. Milcic, and T. C. Velickovic, 2016. Noncovalent interactions of bovine α -lactalbumin with green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate. *Food Hydrocolloids* 61: 241-250
- Ali, M., Th. Homann, M. Khalil, H-P Kruse, and H. Rawel, 2013. Milk Whey Protein Modification by Coffee-Specific Phenolics: Effect on Structural and Functional Properties. *J. Agric. Food Chem*, 61 (28):6911-6920.
- Apenten R. K. O. and D. Galani, 2000. Protein stability function relations: native β -lactoglobulin sulphhydryl–disulphide exchange with PDS. *J Sci Food Agric* 80:447-452
- Barbana, C., Perez, M. D., Sanchez, L., Dalgalarrrondo, M., Chobert, J. M., and Haertle, T. 2006. Interaction of bovine α -lactalbumin with fatty acids as determined by partition equilibrium and fluorescence spectroscopy. *International Dairy Journal*, 16(1): 18-25.
- Beara IN, Lesjak MM, Orc'ic' DZ, Simin NĐ, C' etojevic'-Simin DD, Bož'in BN, Mimica-Dukic'NM. 2012. Comparative analysis of phenolic profile, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activity of two closely-related Plantain species: *Plantago altissima* L. and *Plantago lanceolata* L. *LWT-Food Sci Technol* 47:64–70.
- Berton-Carabin C, Genot C, Gaillard C, Guibert D, Ropers MH. 2013. Design of interfacial films to control lipid oxidation in oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids* 33:99–105.
- Bohin M.C., J.P. Vincken, H.T.W.M. van der Hijden, H. Gruppen. 2012. Efficacy of food proteins as carriers for flavonoids. *J Agric Food Chem* 60: 4136–4143.
- Cao, Y. and Y. L. Xiong, 2017. Interaction of Whey Proteins with Phenolic Derivatives Under Neutral and Acidic pH Conditions. *Journal of Food Science* 00 (0): 1-11

- Carson, M., J. K. Keppler, G. Brackman, D. Dawood, M. Vandrovцова, K. F. El-Sayed, T. Coenye, K. Schwarz, S. A. Clarke, A. G. Skirtach and T. E.L. Douglas, 2019. Whey Protein Complexes with Green Tea. Polyphenols: Antimicrobial, Osteoblast-Stimulatory, and Antioxidant Activities. *Cells Tissues Organs*. 1-12. DOI: 10.1159/000494732
- Courthaudon JL, Dickinson E, Matsumura Y and Williams A, 1991. Influence of emulsifier on the competitive adsorption of whey proteins in emulsions. *Food Struct* 10:109-115.
- De Freitas, V., and Mateus, N. 2001. Structural features of procyanidin interactions with salivary proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 940–945.
- Ferruzzi, M. G., 2010. The influence of beverage composition on delivery of phenolic compounds from coffee and tea. *Physiology & Behavior*, 100(1): 33-41.
- Fox, P.F. and McSweeney, P.L.H. 1998. *Dairy Chemistry and Biochemistry*, 1st ed.; Blackie Academic & Professional: London, UK, pp. 157–158.
- Gallo, M., G. Vinci, G. Graziani, C. De Simone, and P. Ferranti. 2013. The interaction of cocoa polyphenols with milk proteins studied by proteomic techniques. *Food Research International* 54: 406–415
- Harnly JM, Bhagwat S, and Lin LZ. 2007. Profiling methods for the determination of phenolic compounds in foods and dietary supplements. *Anal Bioanal Chem* 389:47–61.
- Hoffman MAM and Van Mil PJJM, 1997. Heat-induced aggregation of beta-lactoglobulin. Role of the free thiol group and disulfide bonds. *J Agric Food Chem* 45:2942-2948.
- Jauregi, P., Y. Guo, and J. B. Adeloje, 2021. Whey proteins-polyphenols interactions can be exploited to reduce astringency or increase solubility and stability of bioactives in foods. *Food Research International* 141: 110019
- Jia, J.J., Gao, X., Hao, M.H., and Tang, L. 2017. Comparison of binding interaction between β -lactoglobulin and three common polyphenols using multi-spectroscopy and modeling methods. *Food Chem*. 228: 143–151.
- Jia Z, Zheng M, Tao F, Chen W, Huang G, and Jiang J. 2016. Effect of covalent modification by (–)-epigallocatechin-3-gallate on physicochemical and functional properties of whey protein isolate. *LWT-Food Sci Technol* 66:305–10.
- Kamau, S. M., S. C., Cheison, and W. Chen, 2010. Xiao-Ming Liu, and Rong-Rong Lu. *Alpha-Lactalbumin: Its Production Technologies and Bioactive Peptides*. Vol. 9, 2010—Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety, 9 : 197-211
- Kanakis, C. D., Hasni, I., Bourassa, P., Tarantilis, P. A., Polissiou, M. G., and Tajmir-Riahi, H. A. 2011. Milk beta-lactoglobulin complexes with tea polyphenols. *Food Chemistry*, 127(3), 1046-1055.
- Keppler J.K., D. Martin, V.M. Garamus, K. Schwarz (2015) Differences in binding behavior of (–)-epigallocatechin gallate to β -lactoglobulin heterodimers (AB) compared to homodimers (A) and (B). *J Mol Recognit* 28: 656–666.
- Kim, H. S., Quon, M. J., and Kim, J. A., 2014. New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate. *Redox Biology*, 2: 187-195.
- Kojima T, Akiyama H, Sasai M, Taniuchi S, Goda Y, Toyoda M, Kobayashi Y. 2000. Antiallergic effect of apple polyphenol on patients with atopic dermatitis: A pilot study. *Allergol Int* 49:69–73.
- Le Bourvellec, C., and Renard, C. M. G. C. 2012. Interactions between polyphenols and macromolecules: Quantification methods and mechanisms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52, 213–248.

- Li, X., Chen, D., Wang, G. and Lu, Y. 2013. Study of interaction between human serum albumin and three antioxidants: Ascorbic acid, alpha-tocopherol, and proanthocyanidins. *Eur. J. Med. Chem.*, 70: 22–36.
- Liang, Y., and Xu, Y. 2003. Effect of extraction temperature on cream and extractibility of black tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze]. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 38, 37–45.
- Liang, L., and Subirade, M., 2010. b-Lactoglobulin/folic acid complexes: Formation, characterization, and biological implication. *J. Phys. Chem. B*, 114, 6707–6712.
- Liu, J., Yong, H., Yao, X., Hu, H., Yun, D., and Xiao, L., 2019. Recent advances in phenolic–protein conjugates: Synthesis, characterization, biological activities and potential applications. *RSC Advances*, 9, 35825–35840.
- Ma, C-M. and X-H. Zhao, 2019. Depicting the Non-Covalent Interaction of Whey Proteins with Galangin or Genistein Using the Multi-Spectroscopic Techniques and Molecular Docking. *Foods*, 8, 360; doi:10.3390/foods8090360
- McKenzie, H. A., and Sawyer, W. H. 1967. Effect of pH on b-lactoglobulins. *Nature*, 214, 1101–1104.
- McClements DJ, Monahan FJ and Kinsella JE, 1993. Disulfide bond formation affects stability of whey protein isolate emulsions. *J Food Sci* 58:1036-1039.
- Moller RE, Stapelfeld H and Skibsted LH, 1998. Thiol reactivity in pressure-unfolded beta-lactoglobulin. Antioxidative properties and thermal refolding. *J Agric Food Chem* 46:425-430.
- Mori K, Goto-Yamamoto N, Kitayama M, and Hashizume K. 2007. Loss of anthocyanins in red-wine grape under high temperature. *J Exp Bot* 58:1935–45.
- Ozdam T, Capanoglu E, and Altay F. 2013. A review on protein–phenolic interactions and associated changes. *Food Res Int* 51:954–70.
- Qin, B. Y., Bewley, M. C., Creamer, L. K., Baker, H. M., Baker, E. N., and Jameson, G. B. 1998. Structural basis of the tanford transition of bovine b-lactoglobulin. *Biochemistry*, 37, 14014–14023.
- Rahayu, P.P., Purwadi, L. E. Radiati and A. Manab, 2015. Physico Chemical Properties of Whey Protein and Gelatine Biopolymer Using Tea Leaf Extract as Crosslink Materials. 3(3): 224-236
- Rahayu, P.P., Dj. Rosyidi, Purwadi, and I. Tohari, 2019. Characteristics of catechin extracted from cocoa husks using microwave assisted extraction (MAE). *BIODIVERSITAS*. 20 (12) : 3626-3631
- Ranadheera, C., Liyanaarachchi, W., Chandrapala, J., Dissanayake, M., and Vasiljevic, T. 2016. Utilizing unique properties of caseins and the casein micelle for delivery of sensitive food ingredients and bioactives. *Trends in Food Science & Technology*, 57, 178–187.
- Rawel HM, Czajka D, Rohn S, and Kroll J. 2002. Interactions of different phenolic acids and flavonoids with soy proteins. *Int J Biol Macromolec* 30:137–50.
- Rodríguez, S.D., M. von Staszewski, and A. M.R. Pilosof, 2015. Green tea polyphenols-whey proteins nanoparticles: Bulk, interfacial and foaming behavior. *Food Hydrocolloids* 50: 108-115
- Sahihi, M. and Ghayeb, Y. 2014. An investigation of molecular dynamics simulation and molecular docking: Interaction of citrus flavonoids and bovine β -lactoglobulin in focus. *Comput. Biol. Med.* 51: 44–50.
- Schneider MD, Esposito D, Lila MA, and Foegeding EA. 2016. Formation of whey protein–polyphenol meso-structures as a natural means of creating functional particles. *Food Funct* 7:1306–18.
- Schwartz SJ, von Elbe JH, Giusti MM. 2008. Colorants. In: Damodaran S, Parkin KL, Fennema OR, editors. *Fennema’s Food Chemistry*. 4th ed. FL: CRC Press (Taylor & Francis Group): Boca Raton. p 599–619.

- Setiowati, A. D., Wijaya, W., and Van der Meeren, P., 2020. Whey protein-polysaccharide conjugates obtained via dry heat treatment to improve the heat stability of whey protein stabilized emulsions. *Trends in Food Science & Technology*, 98, 150–161.
- Shpigelman A, Israeli G, and Livney YD. 2010. Thermally-induced protein–polyphenol coassemblies: beta lactoglobulin-based nanocomplexes as protective nanovehicles for EGCG. *Food Hydrocoll* 24:735–43.
- Taylor MJ and Richardson T, 1980. Antioxidant activity of skim milk: effect of heat and resultant sulfhydryl groups. *J Dairy Sci* 63:1783-1795.
- von Staszewski M., A.M.R. Pilosof and R.J. Jagus, 2011. Influence of green tea polyphenols on the colloidal stability and gelation of WPC. *Food Hydrocolloids*. 25 (5):1077-1084
- Wang, Y.;Wang, X.Y. 2015. Binding, stability, and antioxidant activity of quercetin with soy protein isolate particles. *Food Chem*. 18: 24–29. Wang X, Zhang J, Lei F, Liang C, Yuan F, Gao Y. 2014. Covalent complexation and functional evaluation of (–)-epigallocatechin gallate and α -lactalbumin. *Food Chem* 150:341–7.
- Wu, G., X. Hui, J. Mu, M. A. Brennan, and C. S. Brennan, 2021. Functionalization of whey protein isolate fortified with blackcurrant concentrate by spray-drying and freeze-drying strategies. *Food Research International* 141: 110025
- Wu, G., X. Hui, X. Gong, K. N. Tran, L. Stipkovits, M. S. Mohan, M. A. Brennan, and C. S. Brennan, 2021. Functionalization of bovine whey proteins by dietary phenolics from molecular-level fabrications and mixture-level combinations *Gang Wu, Trends in Food Science & Technology* 110: 107–119
- Zhang, Y., Y. Lu, Y. Yang, S. Li, C. Wang, C. Wang, and T. Zhang, 2021. Comparison of non-covalent binding interactions between three whey proteins and chlorogenic acid: Spectroscopic analysis and molecular docking. *Food Bioscience* 41: 101035
- Zhu F, Asada T, Sato A, Koi Y, Nishiwaki H, and Tamura H. 2014. Rosmarinic acid extract for antioxidant, antiallergic, and α -glucosidase inhibitory activities, isolated by supramolecular technique and solvent extraction from *Perilla* leaves. *J Agric Food Chem* 62:885–92.