

## Characterization of the Covalent Complex Derived from Interaction between Milk Thistle Protein and Rosemary Phenolic Extract

Haniya Tavakoli Fard<sup>1</sup>, Alireza Sadeghi Mahonak<sup>2\*</sup>, Morteza Khomeiri<sup>2</sup>,  
Mona Ranjbar<sup>3</sup>

<sup>1</sup> M.Sc. student, Dept. of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resources, Gorgan, Iran

<sup>2</sup> (Corresponding author) Professor, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran, Email: sadeghiaz@gau.ac.ir

<sup>3</sup> Ph.D. student, Dept. of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resources, , Gorgan, Iran

### Article Info

#### Article type:

Full Length Research Paper

#### Article history:

Received: 2026-02-05

Revised: 2026-02-22

Accepted: 2026-02-28

#### Keywords:

Protein concentrate

Milk thistle

Rosemary

Covalent complex

Antioxidant capacity

### ABSTRACT

**Background and Objective:** Plant protein concentrates, owing to their high protein content and low fat levels, are considered suitable matrices for targeted chemical modifications and for investigating molecular interactions with bioactive compounds. Proteins derived from milk thistle seeds (*Silybum marianum* L.), with a balanced amino acid profile and favorable structural characteristics, exhibit a high potential for interaction with phenolic compounds from medicinal plants—interactions that can lead to enhanced antioxidant activity and improved stability of inherently unstable phenolic compounds. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) is a rich source of phenolic compounds with strong antioxidant activity and has the ability to form stable covalent complexes with proteins. The main objective of this study was to investigate the formation of covalent complexes between milk thistle protein concentrate and rosemary extract and to evaluate the effects of this interaction on antioxidant activity and phenolic contents of complex.

**Materials and Methods:** Milk thistle seeds and rosemary plants were collected and dried. The seeds were defatted, and a protein concentrate was prepared. The phenolic extract of rosemary was obtained using a hydroalcoholic solvent extraction and subsequently mixed with the protein concentrate at different concentrations (1–6%) to induce the formation of covalent complexes. Total phenolic content, flavonoid content, total antioxidant capacity, and ferric reducing power of the samples were determined using the Folin–Ciocalteu colorimetric method, spectrophotometric assays, and the phosphomolybdenum method, respectively. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test at a 95% confidence level.

**Results:** Chemical composition analysis revealed that the milk thistle protein concentrate contained 53.47% protein and 2.04% fat. Rosemary extract exhibited considerable amounts of phenolic compounds (56.50 mg GAE/g) and flavonoids (9 mg QE/g). The formation of covalent complexes resulted in a significant increase in

---

phenolic content; as the rosemary extract concentration increased from 1% to 6%, total phenolics rose from 233.31 mg GAE/g to 900.153 mg GAE/g. Moreover, the total antioxidant capacity of the system increased in a concentration-dependent manner, with the lowest activity observed in the pure protein concentrate and the highest activity in the complex containing 6% rosemary extract. These findings indicate the successful formation of stable phenolic–protein complexes and their positive effect on antioxidant activity.

**Conclusion:** The formation of covalent complexes between milk thistle protein concentrate and rosemary phenolic extract is considered an effective approach for increasing total phenolic content and enhancing the antioxidant capacity of the system. The results showed that increasing the concentration of rosemary extract led to a significant increase in total phenolic compounds and antioxidant activity, which indicates the occurrence of effective and substantial interactions between the protein matrix and phenolic compounds. Based on the present findings, this system possesses appropriate potential for use as a plant-based functional additive in food formulations. The results of this study are consistent with previously reported studies on protein–phenolic interactions.

---

**Cite this article:** Tavakoli Fard, H., Sadeghi Mahonak, A.R., Khomeiri, M., Ranjbar, M. 2026. The Characterization of the Covalent Complex Derived from Interaction between Milk Thistle Protein and Rosemary Phenolic Extract. *Food Processing and Preservation Journal*, 18(2), 67-82.



© The Author(s)



<https://doi.org/10.22069/fppj.2026.24510.1923>

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

---

## بررسی خصوصیات کمپلکس حاصل از برهم‌کنش کووالانسی بین پروتئین خارمریم و عصاره فنولی رزماری

هانیا توکلی فرد<sup>۱</sup>، علیرضا صادقی ماهونک<sup>۲\*</sup>، مرتضی خمیری<sup>۳</sup>، منا رنجبر<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

<sup>۲</sup> (نویسنده مسئول) استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران، رایانامه: sadeghiaz@gau.ac.ir

<sup>۳</sup> دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

| اطلاعات مقاله                                                                                              | چکیده                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>نوع مقاله:</b><br>مقاله کامل علمی- پژوهشی                                                               | <b>سابقه و هدف:</b> کنسانتره‌های پروتئینی گیاهی به دلیل دارا بودن محتوای بالای پروتئین و چربی پایین، بستر مناسبی برای ایجاد اصلاحات شیمیایی هدفمند و بررسی برهم‌کنش‌های مولکولی با ترکیبات زیست‌فعال محسوب می‌شوند. پروتئین‌های دانه خارمریم ( <i>Silybum marianum</i> L.) با توزیع متعادل اسیدهای آمینه و ویژگی‌های ساختاری مناسب، ظرفیت بالایی برای برهم‌کنش با ترکیبات فنولی گیاهان دارویی دارند؛ برهم‌کنشی که می‌تواند منجر به افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی و بهبود پایداری ترکیبات فنولی ناپایدار شود. رزماری ( <i>Rosmarinus officinalis</i> ) منبع غنی ترکیبات فنولی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا است که توانایی تشکیل کمپلکس‌های کووالانسی پایدار با پروتئین‌ها را دارد. هدف اصلی این مطالعه، بررسی تشکیل کمپلکس کووالانسی بین کنسانتره پروتئین خارمریم و عصاره رزماری و ارزیابی اثر این برهم‌کنش بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی و پایداری ترکیبات فنولی می‌باشد. |
| تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۱۱/۱۶<br>تاریخ ویرایش: ۱۴۰۴/۱۲/۰۳<br>تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۲/۰۹                            | <b>مواد و روش‌ها:</b> دانه‌های خارمریم و گیاه رزماری جمع‌آوری و خشک شده، سپس دانه‌ها چربی‌گیری و کنسانتره پروتئینی تهیه شد. عصاره فنولی رزماری با حلال هیدروالکلی استخراج و با کنسانتره پروتئینی در غلظت‌های مختلف (۱ تا ۶ درصد) مخلوط گردید تا کمپلکس‌های کووالانسی تشکیل شود. ترکیبات فنولی کل، فلاونوئیدها، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل و قدرت احیاکنندگی آهن در نمونه‌ها با روش‌های رنگ‌سنجی Folin-Ciocalteu، اسپکتروفتومتری و فسفومولیدن سنجیده شد. تحلیل آماری با آزمون ANOVA و مقایسه دانکن در سطح ۹۵٪ انجام شد.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| <b>واژه‌های کلیدی:</b><br>کنسانتره پروتئین<br>خارمریم<br>رزماری<br>کمپلکس کووالانسی<br>ظرفیت آنتی‌اکسیدانی | <b>یافته‌ها:</b> آنالیز ترکیب شیمیایی نشان داد که کنسانتره پروتئینی خارمریم دارای ۵۳/۴۷٪ پروتئین و ۲/۰۴٪ چربی است. عصاره رزماری مقادیر قابل توجهی ترکیبات فنولی (۵۶/۵۰ mg GAE/g) و فلاونوئید (۹ mg QE/g) داشت. تشکیل کمپلکس‌های کووالانسی منجر به افزایش معنادار میزان ترکیبات فنولی شد؛ با افزایش درصد عصاره رزماری از ۱ تا ۶٪، کل فنول‌ها از ۳۱/۲۳۳ mg GAE/g به ۱۵۳/۹۰۰ mg GAE/g رسید. همچنین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل سیستم به‌طور وابسته به غلظت عصاره افزایش یافت، به‌گونه‌ای که پایین‌ترین ظرفیت متعلق به کنسانتره                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |

پروتئین خالص و بالاترین به کمپلکس با ۶٪ عصاره رزماری تعلق داشت. این نتایج نشان‌دهنده موفقیت تشکیل کمپلکس‌های فنولی- پروتئینی پایدار و اثر مثبت بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی است.

**نتیجه‌گیری:** تشکیل کمپلکس‌های کووالانسی بین کنسانتره پروتئین خارمریم و عصاره فنولی رزماری، رویکردی مؤثر برای افزایش محتوای ترکیبات فنولی و تقویت ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سیستم محسوب می‌شود. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت عصاره رزماری، میزان ترکیبات فنولی کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی به‌طور معناداری افزایش می‌یابد که این امر بیانگر وقوع برهم‌کنش مؤثر و قابل‌توجه میان ماتریس پروتئینی و ترکیبات فنولی است. بر اساس یافته‌های حاضر، این سامانه از پتانسیل مناسبی برای استفاده به‌عنوان یک افزودنی فراسودمند با منشأ گیاهی در فرمولاسیون‌های غذایی برخوردار است. نتایج این پژوهش با مطالعات پیشین گزارش شده در زمینه برهم‌کنش پروتئین- فنول همخوانی دارد.

استناد: توکلی‌فرد، هانیا؛ صادقی‌ماهونک، علیرضا؛ خمیری، مرتضی؛ رنجبر، منا. (۱۴۰۵). بررسی خصوصیات کمپلکس حاصل از برهم‌کنش کووالانسی بین پروتئین خارمریم و عصاره فنولی رزماری. *فرآوری و نگهداری مواد غذایی*، ۱۸(۲)، ۸۲-۶۷.



<https://doi.org/10.22069/fppj.2026.24510.1923>

© نویسندگان



ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

## مقدمه

کنسانتره‌های پروتئینی گیاهی به دلیل دارا بودن غلظت بالای پروتئین و محتوای پایین چربی، به‌طور گسترده به‌عنوان منابع پروتئینی مورد توجه قرار گرفته‌اند و بستر مناسبی برای انجام اصلاحات شیمیایی و بررسی برهم‌کنش‌های مولکولی فراهم می‌کنند. وجود گروه‌های عاملی واکنش‌پذیر در ساختار این پروتئین‌ها، امکان انجام واکنش با ترکیبات زیست‌فعال گیاهی را فراهم ساخته و آن‌ها را به گزینه‌هایی مناسب برای مطالعه برهم‌کنش‌های پروتئین- فنول تبدیل کرده است (۲۰۱۱).

خارمریم (*Silybum marianum* L.) گیاهی متعلق به خانواده کاسنیان است که منشأ آن به نواحی مدیترانه بازمی‌گردد، هرچند امروزه در مناطق مختلف جهان به‌طور گسترده کشت می‌شود. دانه‌های این گیاه، که معمولاً پس از استخراج ترکیبات دارویی به‌عنوان پسماند باقی می‌مانند، منبع قابل‌توجهی از پروتئین محسوب می‌شوند و حدود ۲۰ تا ۲۵ درصد از ترکیب آن‌ها را پروتئین‌هایی با توزیع نسبتاً متعادل اسیدهای آمینه ضروری تشکیل می‌دهد. بر اساس گزارش‌های پیشین، پروتئین‌های استخراج‌شده از دانه خارمریم، به‌ویژه پس از انجام فرایند هیدرولیز، توان بالقوه‌ای در بروز فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی از خود نشان می‌دهند (۳).

رزماری (*Rosmarinus officinalis*) یکی از گیاهان دارویی ارزشمند است که ترکیبات فنولی فعالی مانند رزمارینیک اسید، کاریوزول و کارنوزیک اسید را در خود جای داده است (۴). این ترکیبات نه تنها دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی هستند، بلکه می‌توانند با گروه‌های آمینی و تیولی پروتئین‌های هیدرولیز شده پیوند کووالانسی برقرار کنند. ایجاد چنین پیوندهای کووالانسی بین پروتئین‌های هیدرولیز شده و ترکیبات فنولی، منجر به شکل‌گیری شبکه‌های

سه‌بعدی پایدار می‌شود که به‌طور چشمگیری ویژگی‌های عملکردی سیستم، از جمله حلالیت، ژل‌سازی، استحکام امولسیون و پایداری رئولوژیکی را تقویت می‌کند (۲۰۱۱).

مکانیسم تشکیل کمپلکس‌های کووالانسی پروتئین- فنول شامل چند مرحله است: ابتدا، اتصال اولیه از طریق پیوند هیدروژنی و برهم‌کنش‌های هیدروفوبیک صورت می‌گیرد، سپس پیوند کووالانسی بین گروه‌های آمینی پروتئین و گروه‌های فنولی برقرار شده و کمپلکس پایدار تشکیل می‌شود (۲۰۱۱). این نوع برهم‌کنش باعث تغییر در ساختار ثانویه و ثالثیه پروتئین می‌شود که می‌تواند خواص فیزیکوشیمیایی و عملکردی پروتئین مانند حلالیت، پایداری رئولوژیکی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی را بهبود بخشد (۵).

مطالعات متعددی به بررسی برهم‌کنش کووالانسی بین پروتئین‌های هیدرولیز شده و ترکیبات فنولی پرداخته‌اند؛ برای مثال، He و همکاران (۲۰۲۳) پیوند کووالانسی میان گلوتن گندم هیدرولیز شده و کلروژنیک اسید را مورد ارزیابی قرار دادند و افزایش قابل توجهی در فعالیت آنتی‌اکسیدانی این کمپلکس‌ها مشاهده شد. این یافته‌ها نشان‌دهنده نقش برجسته ترکیبات فنولی در بهبود و تقویت ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده هستند (۶).

هدف اصلی این مطالعه، بررسی تشکیل کمپلکس کووالانسی بین کنسانتره پروتئین خارمریم و عصاره روزماری و ارزیابی اثرات آن بر فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی کمپلکس حاصل است. نتایج این مطالعه می‌تواند اطلاعات مهمی برای کاربرد صنعتی این ترکیب، توسعه افزودنی‌های فراسودمند و بهبود ارزش تغذیه‌ای و سلامتی محصولات غذایی فراهم آورد (۵ و ۷).

## مواد و روش‌ها

**مواد شیمیایی:** مواد شیمیایی شامل پتاسیم فری سیانید، فریک کلراید، تری کلرواستیک اسید، اسید آسکوربیک، اتانول ۹۶٪، سدیم هیدروکسید، اسید کلریدریک و پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات از شرکت Sigma-Aldrich تهیه شدند. تمامی مواد مورد استفاده دارای درجه آزمایشگاهی بودند.

**آماده‌سازی مواد اولیه:** دانه‌های خار مریم (*Silybum marianum* (L.) Gaertn) و گیاه رزماری (*Rosmarinus officinalis* L.) از بازار محلی شهر گرگان در فصل بهار تهیه شدند. نمونه‌های گیاهی جهت کاهش رطوبت اولیه، در آون (مدل VO 200، شرکت Memmert) با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. پس از خشک شدن، مواد به‌صورت جداگانه آسیاب و به پودر یکنواخت تبدیل گردیدند. پودر دانه خار مریم به‌منظور حذف چربی، به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط با هگزان استخراج شد (۸). پس از تبخیر کامل حلال، نمونه خشک شده از الک با مش ۵۰ عبور داده شد تا یکنواختی اندازه ذرات تضمین شود (۹).

**استخراج کنسانتره پروتئینی دانه خار مریم:** به‌منظور تهیه کنسانتره پروتئینی، پودر چربی‌زدایی شده دانه خار مریم با نسبت ۱:۱۰ (وزنی/حجمی) در آب مقطر حل شد. مخلوط با استفاده از محلول سدیم هیدروکسید ۱ نرمال تا pH ۱۰ تنظیم گردید تا حداکثر انحلال‌پذیری پروتئین حاصل شود. پس از هم‌زدن به مدت یک ساعت در دمای محیط، مخلوط در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با دور ۶۰۰۰ g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ (مدل Combi 514R، شرکت Hanil، کره جنوبی) شد. سوپرناتانت جمع‌آوری و pH آن با اسید کلریدریک ۱ نرمال تا ۴ تنظیم شد تا رسوب پروتئینی در نقطه ایزوالکتریک تشکیل گردد. سوسپانسیون حاصل مجدداً سانتریفیوژ شد و رسوب نهایی پس از

شستشو با آب مقطر، به کمک خشک‌کن انجمادی (مدل FDB-5503، شرکت Operon، کره جنوبی) خشک گردید (۱۰).

**تعیین ترکیب شیمیایی:** آنالیز ترکیب شیمیایی شامل اندازه‌گیری رطوبت، پروتئین کل، چربی و خاکستر برای دانه خام، پودر چربی‌زدایی شده و کنسانتره پروتئینی انجام شد. رطوبت با خشک کردن نمونه‌ها در دمای ۱۰۵°C تا رسیدن به وزن ثابت تعیین گردید (۱۱). مقدار پروتئین کل با روش کج‌لدال و با استفاده از ضریب تبدیل ۶/۲۵ محاسبه شد (۱۲). چربی کل به روش سوکسله و با استفاده از هگزان استخراج گردید (۱۳). برای تعیین خاکستر، نمونه‌ها در کوره با دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد سوزانده شدند (۱۴). کلیه آزمون‌ها در سه تکرار انجام و نتایج به‌صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار گزارش شدند.

**تهیه عصاره فنولی گیاه رزماری:** برای به دست آوردن عصاره فنولی، گیاه رزماری ابتدا با حلال هیدروالکلی (اتانول:آب ۷۰:۳۰٪) به نسبت وزنی-حجمی ۱۰٪ ترکیب شد. سپس محلول به دست آمده با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۴ ساعت هم زده شد. پس از صاف کردن، عصاره با استفاده از روتاری اوپراتور تغلیظ گردید و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. در نهایت، نمونه‌ها توسط خشک‌کن انجمادی خشک شده و تا زمان استفاده در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۱۵).

**تشکیل کمپلکس کووالانسی پروتئین-عصاره رزماری:** پروتئین کنسانتره دانه خار مریم با غلظت ۲٪ (وزنی/حجمی) در آب مقطر حل و به مدت ۲ ساعت هم زده شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای القای برهمکنش کووالانسی، pH محلول به ۹ تنظیم و عصاره فنولی رزماری در غلظت‌های ۱، ۲، ۴ و ۶٪ (وزنی/حجمی) به آن افزوده شد. پس از ۲۴ ساعت

فلاونوئید کل با استفاده از منحنی استاندارد کوئرستین و براساس معادله  $Y = 0.0013x + 0.2105$  و ضریب تصحیح  $R^2 = 0.9864$ ، محاسبه شد (۲۰).

#### آزمون‌های مربوط به کمپلکس پروتئین هیدرولیزشده- عصاره فنولی رزماری

آماده‌سازی و معرفی نمونه‌ها: نمونه‌های مورد بررسی شامل کنسانتره پروتئینی دانه خار مریم و کمپلکس‌های کووالانسی پروتئین - عصاره فنولی رزماری بودند. در تمامی تیمارها، غلظت پروتئین برابر با ۲٪ (وزنی/حجمی) در نظر گرفته شد. کمپلکس‌ها به گونه‌ای تهیه شدند که غلظت پروتئین کنسانتره ثابت بوده و مقدار عصاره فنولی رزماری به ترتیب ۱، ۲، ۴ و ۶٪ (وزنی/حجمی) تغییر داده شد.

تعیین ترکیبات فنولی کل کمپلکس‌ها: برای اندازه‌گیری ترکیبات فنولی کل، ۲۰ میکرولیتر از هر نمونه با ۶/۱ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین-سیوکالتو مخلوط شد. پس از ۵ دقیقه، ۳۰۰ میکرولیتر محلول کربنات سدیم ۲۰٪ افزوده و نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. جذب محلول‌ها در طول موج ۷۶۰ نانومتر اندازه‌گیری و نتایج بر حسب میلی‌گرم معادل اسید گالیک گزارش شد (۱۹).

اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل: ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل نمونه‌ها بر اساس روش فسفومولیدین با اصلاحات جزئی تعیین شد (۲۱).

بدین منظور، ۲۰ میکرولیتر از محلول نمونه (با غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با ۱ میلی‌لیتر معرف واکنش شامل اسید سولفوریک ۰/۶ مولار، فسفات سدیم ۲۸ میلی‌مولار و آمونیوم مولیدات ۴ میلی‌مولار مخلوط شد. نمونه‌ها به مدت ۹۰ دقیقه در حمام آب با دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از خنک شدن، جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۹۵ نانومتر

واکنش، pH مخلوط‌ها به ۷ تنظیم و نمونه‌ها پس از دیالیز، به وسیله خشک‌کن انجمادی به پودر تبدیل شدند (۱۶).

حذف ترکیبات فنولی آزاد: به منظور جداسازی فنول‌های آزاد، کمپلکس‌های تهیه‌شده در کیسه‌های دیالیز با غشای ۱۲ kDa قرار داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در برابر آب دیونیزه دیالیز شدند. آب دیالیز به طور متناوب تعویض شد تا حذف کامل ترکیبات فنولی آزاد تضمین گردد. سپس کمپلکس‌های دیالیز شده جهت انجام آزمون‌های فنولی و آنتی‌اکسیدانی مورد استفاده قرار گرفتند (۱۷ و ۱۸).

اندازه‌گیری ترکیبات فنولی عصاره رزماری: برای تعیین مقدار ترکیبات فنولی کل عصاره رزماری، ۲۰ میکرولیتر از نمونه با ۱/۶ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین-سیوکالتو مخلوط شد و به مدت ۵ دقیقه هم زده شد. سپس ۳۰۰ میکرولیتر محلول کربنات سدیم ۲۰٪ به مخلوط افزوده و نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در بن‌ماری با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در انتها، جذب محلول‌ها با استفاده از اسپکتوفتومتر مرئی-ماورا بنفش (مدل T80، ساخت انگلستان) در طول موج ۷۶۰ نانومتر اندازه‌گیری و مقدار ترکیبات فنولی بر اساس منحنی استاندارد اسید گالیک و با استفاده از معادله  $Y = 0.0006x + 0.1073$  و ضریب تصحیح  $R^2 = 0.9823$ ، محاسبه شد (۱۹).

اندازه‌گیری فلاونوئید کل عصاره رزماری: به منظور تعیین مقدار فلاونوئید کل، ۱ میلی‌لیتر از عصاره با ۰/۵ میلی‌لیتر محلول نیتريت سدیم ۵٪ مخلوط شد. پس از گذشت ۶ دقیقه، ۰/۵ میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم ۱۰٪ افزوده شد و پس از ۶ دقیقه دیگر، ۲ میلی‌لیتر سدیم هیدروکسید ۱ مولار به مخلوط اضافه گردید. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۰ نانومتر قرائت و مقدار

اندازه‌گیری شد؛ جذب بالاتر نشان‌دهنده ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بیشتر بود.

**ارزیابی قدرت احیاکنندگی آهن:** نمونه‌ها ابتدا در آب مقطر با غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر حل شدند. سپس ۱ میلی‌لیتر از هر نمونه با ۵/۲ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار (pH: ۶/۶) و ۲/۵ میلی‌لیتر محلول فری‌سیانید پتاسیم ۱٪ مخلوط و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از آن، ۰/۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید ۱۰٪ افزوده و مخلوط‌ها به مدت ۱۰ دقیقه سونتریفیوژ شدند. در ادامه، ۱ میلی‌لیتر از سوپرناتانت با ۱ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۲ میلی‌لیتر فریک کلراید ۰/۱٪ (حجمی/وزنی) مخلوط و جذب نهایی در طول موج ۷۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. افزایش جذب به‌عنوان شاخص افزایش قدرت احیاکنندگی در نظر گرفته شد (۲۲).

### تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شدند. داده‌ها با استفاده از آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه (ANOVA) مورد تحلیل قرار گرفتند و مقایسه میانگین‌ها به وسیله آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد انجام شد. کلیه تحلیل‌های آماری با نرم‌افزار SPSS انجام و نمودارها با استفاده از Excel ترسیم شدند. تمامی آزمون‌ها در سه تکرار مستقل انجام و نتایج به‌صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار گزارش گردید.

### یافته‌ها

ترکیب شیمیایی دانه‌های خام خارمریم، دانه‌های چربی‌گیری شده و کنسانتره پروتئین در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱- ترکیب شیمیایی دانه خام خارمریم، دانه چربی‌گیری شده و کنسانتره پروتئینی

Table 1. Proximate composition of raw milk thistle seed, defatted seed, and protein concentrate

| نمونه<br>Sample                                                 | پروتئین<br>Protein (%) | چربی<br>Fat (%)    | خاکستر<br>Ash (%) | رطوبت<br>Moisture (%) |
|-----------------------------------------------------------------|------------------------|--------------------|-------------------|-----------------------|
| دانه خام خارمریم<br>(Raw milk thistle seed)                     | c 22.84 $\pm$ 0.63     | a 27.63 $\pm$ 0.91 | c 5.12 $\pm$ 0.18 | a 8.41 $\pm$ 0.27     |
| دانه چربی‌گیری شده خارمریم<br>(Defatted milk thistle seed)      | b 34.92 $\pm$ 0.74     | b 3.18 $\pm$ 0.22  | b 6.01 $\pm$ 0.21 | b 7.26 $\pm$ 0.31     |
| کنسانتره پروتئینی خارمریم<br>(Milk thistle protein concentrate) | a 53.47 $\pm$ 1.12     | b 2.04 $\pm$ 0.19  | c 4.68 $\pm$ 0.17 | c 6.12 $\pm$ 0.28     |

میانگین  $\pm$  انحراف معیار، n = 3؛ درصد وزنی با حروف نشان‌دهنده تفاوت‌های معنادار آماری ( $p < 0.05$ ) بین نمونه‌ها (mean  $\pm$  SD, n = 3; Wt%) with letters indicating significant differences ( $p < 0.05$ ) among treatments

نتایج حاصل از آنالیز ترکیب شیمیایی دانه خام خارمریم نشان داد که مقادیر اندازه‌گیری‌شده با گزارش‌های پیشین در این زمینه هم‌راستا است. Aziz و همکاران (۲۰۲۱) میزان پروتئین، چربی، رطوبت و خاکستر دانه خارمریم را به ترتیب ۲۳٪، ۲۶/۰۵٪، ۴/۴۸٪ و ۱/۹۳٪ بر پایه وزن خشک گزارش کردند (۲۳). در مطالعه‌ای دیگر، Li و همکاران

(۲۰۱۳) مقادیر ۱۹/۹۵٪ پروتئین، ۴۶/۸۴٪ چربی، ۵/۵۰٪ رطوبت و ۶/۴۶٪ خاکستر را برای دانه خام خارمریم ارائه داده و نشان دادند که پس از چربی‌گیری، محتوای پروتئین به ۳۷/۵۲٪ افزایش می‌یابد (۲۴). اختلاف مشاهده‌شده در مقادیر چربی، رطوبت و خاکستر میان مطالعات مختلف می‌تواند به تفاوت در واریته گیاهی، شرایط اقلیمی محل کشت و

بوده و می‌تواند نشان‌دهنده ظرفیت بالای آن در فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی باشد.

مطالعات پیشین، از جمله پژوهش Dhouibi و همکاران (۲۰۲۳) عصاره‌های رزماری حاصل از استخراج اولتراسوند با حلال اتانولی را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد محتوای کل ترکیبات فنولی حدود  $49/14 \text{ mg GAE/g}$  بود (۲۵). همچنین، در مطالعه‌ای دیگر روی عصاره اتانولی رزماری، مقدار کل فنول  $44/56 \text{ mg GAE/g}$  عصاره خشک گزارش شده است که با یافته‌های حاضر هماهنگی دارد (۲۶).

**میزان فلاونوئید عصاره رزماری:** مقدار فلاونوئید کل در عصاره رزماری برابر با  $9 \text{ mg QE/g}$  اندازه‌گیری شد. مطالعات پیشین، از جمله پژوهش Zeghad و Merghem (۲۰۱۶)، محتوای فلاونوئید کل را در عصاره‌های هیدروالکلی رزماری  $9/075 \text{ mg QE/g}$  گزارش کرده‌اند که با داده‌های به‌دست‌آمده در این مطالعه هم‌راستا است (۲۷).

در تحقیق دیگری، Megateli و Krea (۲۰۱۸) با بهره‌گیری از شرایط استخراج هیدروالکلی، مقدار  $1/5 \text{ mg QE/g} \pm 14/48$  را گزارش کردند که اندکی بالاتر از مقادیر این مطالعه است. این تفاوت احتمالاً ناشی از اختلاف در پارامترهای استخراج و شرایط آماده‌سازی عصاره‌ها می‌باشد (۲۸).

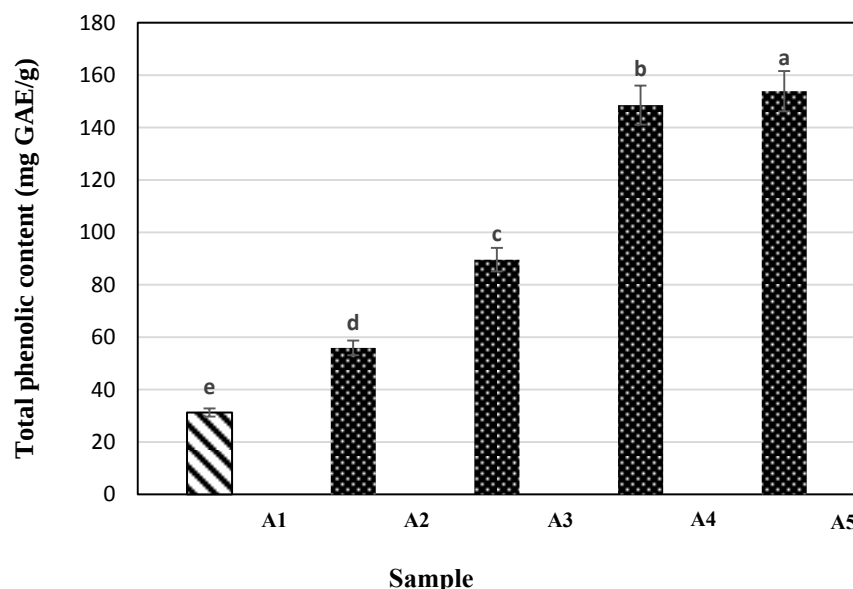
براساس نتایج مطالعه Corbu و همکاران (۲۰۲۲)، محتوای کل ترکیبات فنولی در عصاره رزماری  $15/62 \pm 0/97 \text{ mg GAE/mL}$  گزارش شد و تقریباً ۸/۵٪ از آن شامل فلاونوئیدها بود. ترکیبات اصلی شناسایی شده شامل اسید رزمارینیک، اسید کافئیک، اسید کلروژنیک، هسپریدین و اپی‌کاتچین بودند که همگی در فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجه نقش داشتند (۲۹).

نیز روش‌های استخراج و آماده‌سازی نمونه‌ها مرتبط باشد. با وجود این تفاوت‌ها، افزایش قابل توجه محتوای پروتئین پس از فرآیند چربی‌گیری، روندی مشترک در اغلب مطالعات از جمله پژوهش حاضر محسوب می‌شود. در این مطالعه، چربی‌گیری موجب افزایش درصد پروتئین دانه تا  $34/92\%$  و کاهش چربی به  $3/18\%$  شد، در حالی که مقادیر رطوبت و خاکستر به ترتیب به  $7/26\%$  و  $6/01\%$  رسیدند. این تغییرات نشان‌دهنده کارایی مناسب فرآیند چربی‌گیری در تمرکز پروتئین و حذف بخش عمده اجزای غیرپروتئینی، به‌ویژه لیپیدها، است.

علاوه بر این، مرحله تغلیظ نیز منجر به تغییرات چشمگیری در ترکیب شیمیایی نمونه‌ها شد. کنسانتره پروتئینی خام‌مریم حاوی  $53/47\%$  پروتئین،  $2/04\%$  چربی،  $6/12\%$  رطوبت و  $4/68\%$  خاکستر بود. افزایش تدریجی محتوای پروتئین هم‌زمان با کاهش چربی، رطوبت و خاکستر در مراحل مختلف فرآوری، بیانگر نقش مؤثر عملیات چربی‌گیری و تغلیظ در حذف اجزای غیرپروتئینی و افزایش خلوص پروتئین است. نتایج گزارش شده توسط Li و همکاران (۲۰۱۳) نیز روند مشابهی را تأیید می‌کند، به‌طوری‌که پس از فرآوری، افزایش پروتئین و کاهش چربی و خاکستر مشاهده شده است (۲۴). کاهش رطوبت و خاکستر در نمونه‌های فرآوری‌شده می‌تواند ناشی از حذف نمک‌ها و ترکیبات معدنی محلول و نیز کاهش میزان آب آزاد در ساختار پروتئینی باشد؛ امری که به‌طور بالقوه موجب بهبود ویژگی‌های عملکردی، افزایش پایداری و ارتقای ماندگاری محصول نهایی می‌شود.

**میزان ترکیبات فنولی عصاره رزماری:** مقدار کل ترکیبات فنولی در عصاره رزماری برابر با  $50/56 \text{ mg GAE/g}$  عصاره خشک اندازه‌گیری شد. این مقدار بیانگر وجود قابل توجه فنول‌ها در عصاره

آزمون‌های مربوط به کمپلکس کنسانتره پروتئین -  
عصاره فنولی  
میزان ترکیبات فنولی: نتایج اندازه‌گیری میزان کل  
ترکیبات فنولی در نمونه‌های مختلف در شکل ۱  
آورده شده است.



- A1: Milk thistle protein concentrate
- Covalent complexes of silymarin protein concentrate – rosemary phenolic extract at different concentrations of 1%(A2), 2%(A3), 4%(A4), and 6%(A5)

شکل ۱- محتوای کل ترکیبات فنولی در نمونه‌های مختلف. ستون‌هایی که حروف متفاوت دارند، از نظر آماری در سطح ۹۵٪ با هم متفاوت هستند.

**Figure 1. Total phenolic content of different samples. Columns with different letters are significantly different at 95% confidence level**

داده‌های کمپلکس‌های کوالانسی نشان داد که با افزایش درصد عصاره رزماری از ۱ تا ۶٪، مقدار کل ترکیبات فنولی به صورت وابسته به غلظت افزایش یافته و از ۵۵/۹۰۰ تا ۱۵۳/۹۰۰ mg GAE/g تغییر کرد. این روند نمایانگر تشکیل موفق کمپلکس‌های فنولی- پروتئینی پایدار است که عمدتاً از طریق پیوندهای کوالانسی بین ترکیبات فنولی فعال عصاره رزماری و گروه‌های نوکلئوفیلی در پروتئین ایجاد می‌شود. مکانیسم تشکیل چنین پیوندهایی معمولاً از طریق اکسیداسیون گروه‌های هیدروکسیل فنولی به فرم‌های کوئینونی و سپس واکنش این فرم‌ها با گروه‌های آمینی یا تیول در پروتئین توصیف شده

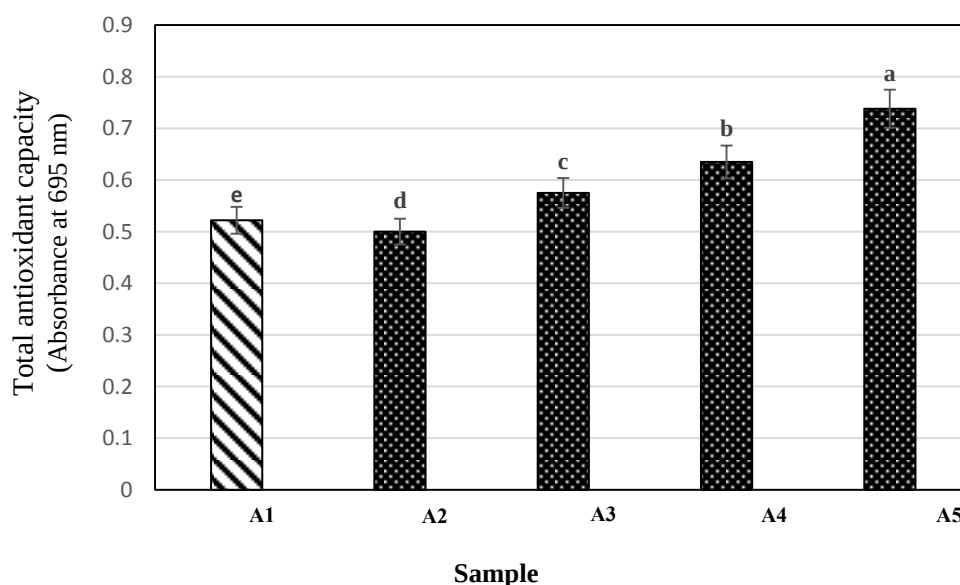
محتوای کل ترکیبات فنولی در نمونه‌های کنسانتره پروتئینی خارمریم و کمپلکس‌های کوالانسی کنسانتره پروتئینی با عصاره فنولی رزماری با استفاده از روش رنگ‌سنجی Folin-Ciocalteu تعیین شد و مقادیر به صورت mg GAE/g sample گزارش گردید (شکل ۱). نتایج نشان داد که تشکیل کمپلکس‌های کوالانسی با عصاره رزماری تأثیر قابل توجهی بر افزایش مقدار ترکیبات فنولی دارد.

مقدار کل ترکیبات فنولی در کنسانتره پروتئینی خارمریم پایین‌ترین مقدار ۳۱/۲۳۳ mg GAE/g را نشان داد که احتمالاً به دلیل محدود بودن گروه‌های واکنش‌پذیر فنولی در ساختار پروتئین بود. تحلیل

و تولید محصولات عملکردی با ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بالا است. مقادیر به‌دست‌آمده در این مطالعه با نتایج گزارش شده توسط سایر پژوهشگران مطابقت دارد (۲، ۳۰-۳۲) و اثربخشی روش به‌کاررفته را در افزایش محتوای فنولی و پتانسیل آنتی‌اکسیدانی این سیستم‌های کمپلکس نشان می‌دهد.

**ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل:** نتایج اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل نمونه‌های مختلف در شکل ۲ آورده شده است.

است (۳۰). این نتایج با شواهد منتشرشده در ادبیات علمی در زمینه تعاملات پروتئین- پلی‌فنول مطابقت دارد. برای مثال، Kim و همکاران (۲۰۲۴) نشان دادند که تعامل بین پروتئین‌های گیاهی و پلی‌فنول‌ها می‌تواند ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولی را افزایش دهد و ساختار پروتئین را به‌نفع تشکیل کمپلکس‌های مولکولی تغییر دهد (۳۱). بنابراین، نتایج حاضر نشان می‌دهد که تشکیل کمپلکس کووالانسی کنسانتره پروتئینی خارمریم با عصاره رزماری، رویکردی مؤثر برای افزایش محتوای ترکیبات فنولی



- A1: Milk thistle protein concentrate
- Covalent complexes of silymarin protein concentrate – rosemary phenolic extract at concentrations of 1%(A2), 2%(A3), 4%(A4), and 6%(A5)

شکل ۲. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در نمونه‌های مختلف.

ستون‌هایی که حروف متفاوت دارند، از نظر آماری در سطح ۹۵٪ با هم متفاوت هستند.

**Figure 2. Total antioxidant capacity of different samples.**

Columns with different letters are significantly different at the 95% confidence level.

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل را نشان داد (بر اساس مقدار جذب ۰/۵۲۲ در طول موج ۶۹۵ نانومتر)، که این موضوع می‌تواند به ساختار نسبتاً متراکم پروتئین، وزن مولکولی بالاتر و محدود بودن دسترسی گروه‌های عاملی فعال برای شرکت در واکنش‌های احیایی نسبت

نتایج آزمون ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (شکل ۲) نشان داد که تشکیل کمپلکس کووالانسی بین کنسانتره پروتئینی خارمریم و ترکیبات فنولی عصاره رزماری تأثیر معنی‌داری بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی سیستم دارد. کنسانتره پروتئینی خارمریم به‌تنهایی کمترین مقدار

داده شود. چنین رفتاری پیش تر نیز برای پروتئین های کامل یا کنسانتره گزارش شده است که در آن ها توان ذاتی انتقال الکترون و مهار رادیکال های آزاد محدودتر است (۳۳).

با تشکیل کمپلکس کوالانسی بین کنسانتره پروتئینی خامریم و عصاره فنولی رزماری، ظرفیت آنتی اکسیدانی کل تغییر یافته و به طور کلی روند افزایشی وابسته به غلظت عصاره مشاهده شد. مقادیر ظرفیت آنتی اکسیدانی برای کمپلکس های حاوی ۱، ۲، ۴ و ۶ درصد عصاره رزماری به ترتیب برابر با ۰/۵۱۱، ۰/۵۴۳، ۰/۹۴۷ و ۱/۱۴ (جذب در طول موج ۶۹۵ نانومتر) بود. افزایش چشمگیر ظرفیت آنتی اکسیدانی در غلظت های بالاتر عصاره رزماری، به ویژه در نمونه های ۴ و ۶ درصد، نشان دهنده نقش مؤثر ترکیبات فنولی در تقویت توان احیاکنندگی سیستم است.

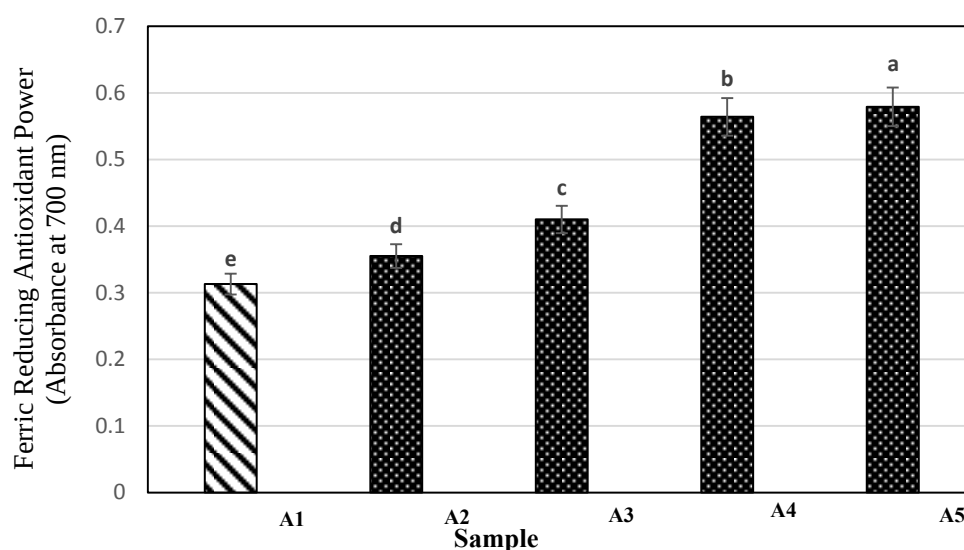
این افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی را می توان به برهم کنش های کوالانسی بین گروه های هیدروکسیل فنولی موجود در عصاره رزماری و گروه های باردار یا قطبی زنجیره های پروتئینی نسبت داد. چنین برهم کنش هایی موجب تثبیت ترکیبات فنولی در ماتریس پروتئینی، افزایش تعداد جایگاه های فعال آنتی اکسیدانی و تسهیل انتقال الکترون در سیستم می شود. مطالعات پیشین نیز نشان داده اند که برهم کنش پروتئین-پلی فنول، حتی در غیاب

پیوندهای کوالانسی، می تواند ظرفیت آنتی اکسیدانی کل را از طریق افزایش پایداری و دسترس پذیری عملکردی ترکیبات فنولی ارتقا دهد (۳۴).

وجود ترکیبات فنولی غنی در عصاره رزماری مانند اسید رزمارینیک، کارنوزیک اسید و کارنوزول که دارای گروه های فعال هیدروکسیل هستند، امکان تشکیل پیوندهای پایدار با پروتئین ها را افزایش می دهد. این موضوع با یافته های مطالعاتی که نشان داده اند کمپلکس های پروتئین- پلی فنول در مقایسه با نمونه های بدون برهم کنش ظرفیت آنتی اکسیدانی بیشتری دارند و از پایداری ساختاری و عملکردی بالاتری برخوردارند، هم راستا است (۲، ۳۱-۳۲).

افزایش معنی دار ظرفیت آنتی اکسیدانی کل در حضور غلظت های بالاتر عصاره رزماری بیانگر مشارکت مؤثرتر گروه های فنولی فعال در واکنش های احیایی و مهار رادیکال های آزاد است. این نتایج با گزارش Feng و همکاران (۲۰۲۳) هم خوانی دارد که نشان دادند افزایش محتوای پلی فنول در سیستم های پروتئین- فنول به طور مستقیم موجب تقویت فعالیت آنتی اکسیدانی می شود (۲).

**قدرت احیاکنندگی آهن:** نتایج اندازه گیری قدرت احیاکنندگی آهن نمونه های مختلف در شکل ۳ آورده شده است.



- A1: Milk thistle protein concentrate
- Covalent complexes of silymarin protein concentrate – rosemary phenolic extract at concentrations of 1%(A2), 2%(A3), 4%(A4), and 6%(A5)

شکل ۳- قدرت احیاکنندگی آهن نمونه های مختلف. ستون‌هایی که حروف متفاوت دارند، از نظر آماری در سطح ۹۵٪ با هم متفاوت هستند.

**Figure 3. Ferric reducing antioxidant power (FRAP) of different samples.**  
Columns with different letters are significantly different at the 95% confidence level.

الکترون‌دهی سیستم در حضور ترکیبات فنولی عصاره رزماری و تقویت فعالیت آنتی‌اکسیدانی کمپلکس‌ها در مقایسه با کنسانتره پروتئینی به‌تنهایی است. مطالعات پیشین نشان داده‌اند که ترکیبات فنولی، به‌ویژه اسیدهای فنولی و فلاونوئیدها، به دلیل دارا بودن گروه‌های هیدروکسیل قادر به انتقال الکترون و احیای یون‌های فلزی هستند (۳۵). در همین راستا، Zhang و همکاران (۲۰۲۴) گزارش کردند که افزایش محتوای فنولی عصاره‌های گیاهی ارتباط مستقیمی با افزایش قدرت احیاکنندگی آهن دارد (۳۶).

افزایش قدرت احیاکنندگی آهن در کمپلکس‌های کنسانتره پروتئینی - عصاره رزماری در این مطالعه احتمالاً ناشی از برهم‌کنش‌های کووالانسی بین گروه‌های هیدروکسیل فنولی و گروه‌های باردار یا قطبی موجود در زنجیره‌های پروتئینی است. این

براساس نتایج به‌دست‌آمده از آزمون احیای آهن (شکل ۳)، کنسانتره پروتئینی خارمریم کمترین قدرت احیاکنندگی آهن را نشان داد که این امر بر اساس مقدار جذب ۰/۳۱۳ در طول موج ۷۰۰ نانومتر مشخص شد. این نتیجه بیانگر توان محدود این نمونه در انتقال الکترون و احیای یون‌های آهن است و می‌تواند به ساختار نسبتاً فشرده پروتئین و دسترسی محدود گروه‌های عاملی فعال نسبت داده شود.

با تشکیل کمپلکس‌های کووالانسی بین کنسانتره پروتئینی خارمریم و عصاره فنولی رزماری، قدرت احیاکنندگی آهن افزایش یافت و این افزایش به‌صورت وابسته به غلظت عصاره مشاهده شد. قدرت احیاکنندگی آهن برای کمپلکس‌های حاوی ۱، ۲، ۴ و ۶ درصد عصاره رزماری به‌ترتیب برابر با ۰/۳۵۵، ۰/۴۱، ۰/۵۶۴ و ۰/۵۷۹ (جذب در طول موج ۷۰۰ نانومتر) بود. این روند افزایشی نشان‌دهنده بهبود توان

برهم کنش ها می توانند منجر به ایجاد ساختارهای پایدارتر، افزایش تعداد سایت های فعال آنتی اکسیدانی و تسهیل انتقال الکترون در سیستم شوند. یافته های حاضر با گزارش های پیشین هم راستا است که نشان داده اند برهم کنش پروتئین ها با ترکیبات فنولی، حتی بدون تشکیل پیوند کووالانسی، قادر است قدرت احیاکنندگی آهن و فعالیت آنتی اکسیدانی کل را به طور معنی داری افزایش دهد (۳۵ و ۳۷).

نشان داد که با افزایش غلظت عصاره رزماری، محتوای کل ترکیبات فنولی، ظرفیت آنتی اکسیدانی کل و قدرت احیاکنندگی آهن کمپلکس ها به طور معنی داری افزایش یافت. این یافته ها بیانگر نقش مؤثر کمپلکس های کووالانسی کنسانتره پروتئینی خارمریم-عصاره فنولی رزماری پتانسیل بالایی برای کاربرد به عنوان ترکیبات طبیعی با فعالیت آنتی اکسیدانی ارتقایافته در صنایع غذایی، دارویی و محصولات زیست پایه دارند.

### نتیجه گیری

برهم کنش کووالانسی بین کنسانتره پروتئینی خارمریم و ترکیبات فنولی عصاره رزماری به عنوان راهبردی مؤثر در بهبود ویژگی های آنتی اکسیدانی سیستم های غذایی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این اثر تحت حمایت مادی بنیاد ملی علم ایران (INSF) برگرفته شده از طرح شماره ۴۰۴۰۲۹۷۱ انجام شده است.

### منابع

1. Zhang, K., Huang, J., Wang, D., Wan, X., & Wang, Y. (2024). Covalent polyphenol-protein interactions in food processing: Formation mechanisms, quantification methods, bioactive effects, and applications. *Frontiers in Nutrition*, 11, 1371401. <https://doi.org/10.3389/fnut.2024.1371401>
2. Feng, Y., Jin, C., Lv, S., Zhang, H., Ren, F., & Wang, J. (2023). Molecular mechanisms and applications of polyphenol-protein complexes with antioxidant properties: A review. *Antioxidants*, 12(8), 1577. <https://doi.org/10.3390/antiox12081577>
3. Nowicki, M., Zieliński, H., et al. (2023). Milk thistle endosperm as an alternative protein source. *Sustainability*, 15(19), 14411. <https://doi.org/10.3390/su151914411>
4. Gölükcü, M. (2022). Carnosol and carnosic acid content of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) related to location and harvest time. *Gıda*, 47(3), 493–501. <https://doi.org/10.15237/gida.GD22010>
5. Liu, F., McClements, D. J., Ma, C., & Liu, X. (2023). Novel colloidal food ingredients: Protein complexes and conjugates. *Annual Review of Food Science and Technology*, 14, 35–61. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-060721-023522>
6. He, D., Xing, Y., Wang, Y., Zeng, W., Gao, W., Su, N., Zhang, C., Chen, H., & Xing, X. H. (2023). Improved functional properties of wheat gluten hydrolysate by covalent conjugation with chlorogenic acid. *International Journal of Food Science and Technology*, 58: 454–462.
7. Tian, R., Han, X., Tian, B., Li, G., Sun, L., Tian, S., Qin, L., & Wang, S. (2023). Effects of covalent binding of different polyphenols on structure, rheology, and functional properties of whey protein isolate. *LWT – Food Science and Technology*, 172, 114968. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114968>
8. AOAC Method 983.23. (1990). Fat in foods, chloroform-methanol extraction. In *Official methods of analysis* (15th ed., pp. 101–111). Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.
9. Wang, M., Hettiarachchy, N. S., Qi, M., Burks, W., & Siebenmorgen, T. (1999). Preparation and functional properties of rice bran protein concentrate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 411–416. <https://doi.org/10.1021/jf980429x>

10. Sofi, S. A., Rafiq, S., Majid, D., Binobead, M. A., Ali, M. A., Elshikh, M. S., & Dar, B. N. (2024). Irradiation-induced modifications of apple seed protein isolate: Exploring techno-functional, structural, thermal, and morphological characteristics. *Radiation Physics and Chemistry*, 225, 112139. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2024.112139>
11. AOAC. (2016). Official methods of analysis of AOAC International (20th ed.). Gaithersburg, MD: AOAC International.
12. Alu'Datt, M. H., Rababah, T., Ereifej, K., & Rawashdeh, R. (2012). Proximate composition and physicochemical properties of defatted Moringa oleifera seed protein concentrate. *Journal of Food Science and Technology*, 49(5), 608–614. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0361-7>
13. Almazan, A. M., & Adeyeye, S. O. (1998). Fat and fatty acid concentrations in some green vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*, 11(4), 375–380. <https://doi.org/10.1006/jfca.1998.0596>
14. AACC. (2000). Approved methods of the American Association of Cereal Chemists (10th ed.). St. Paul, MN: AACC International.
15. Petretto, G. L., et al. (2020). *Phenolic compounds extraction from distilled ground rosemary leaves at different acetone concentrations and their antioxidant activities*. *Journal of Food Science and Technology*, 57(9), 3123–3133.
16. Li, D., Zhu, L., Wu, Q., Chen, Y., Wu, G., & Zhang, H. (2024). Tartary buckwheat protein–phenol conjugate prepared by alkaline-based environment: Identification of covalent binding sites of phenols and alterations in protein structural and functional characteristics. *International Journal of Biological Macromolecules*, 257, 127504. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127504>
17. Sęczyk, Ł., Świeca, M., Kapusta, I., & Gawlik-Dziki, U. (2019). Protein–phenolic interactions as a factor affecting the physicochemical properties of white bean proteins. *Foods*, 8(1), 23. <https://doi.org/10.3390/foods8010023>
18. Aktaş, H., Szpicer, A., Strojny-Cieślak, B., Borucki, W., Schweiggert-Weisz, U., & Kurek, M. A. (2025). Molecular interplay
19. Arabshahi-Delouee, S., & Urooj, A. 2007. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. *Food Chemistry*, 102(4): 1233–1240.
20. Šamec, D., Piljac-Žegarac, J., Bogović, M., Habjanič, K., & Grúz, J. (2011). Antioxidant potency of white (*Brassica oleracea* L. var. capitata) and Chinese (*Brassica rapa* L. var. pekinensis (Lour.)) cabbage: The influence of development stage, cultivar choice and seed selection. *Scientia Horticulturae*, 128(2), 78–83. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.01.010>
21. Nalinanon, S., Benjakul, S., Kishimura, H., & Shahidi, F. (2011). Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream. *Food Chemistry*, 124(4), 1354–1362. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.089>
22. Ahmadi, F., Kadivar, M., & Shahedi, M. (2007). Antioxidant activity of *Kelussia odoratissima* Mozaff. extracts in model systems. *Food Chemistry*, 105(1), 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.056>
23. Aziz, M.; Saeed, F.; Ahmad, N.; Ahmad, A.; Afzaal, M.; Hussain, S.; Anjum, F.M. Biochemical profile of milk thistle (*Silybum marianum* L.) with special reference to silymarin content. *Food Sci. Nutr.* 2021, 9, 244–250.
24. Li, F., Wu, X., Zhao, T., Li, F., Zhao, J., & Yang, L. (2013). Extraction, physicochemical, and functional properties of proteins from milk thistle *Silybum marianum* L. gaernt seeds. *International Journal of Food Properties*, 16(8), 1750–1763. <https://doi.org/10.1080/10942912.2011.608176>
25. Dhouibi, N., Manuguerra, S., Arena, R., Messina, C. M., Santulli, A., Kacem, S., Dhaouadi, H., & Mahdhi, A. (2023). *Impact of the extraction method on the chemical composition and antioxidant potency of Rosmarinus officinalis L. extracts*. *Metabolites*, 13(2), 290. <https://doi.org/10.3390/metabo13020290>
26. Yeddes, W., Majdi, H., Gadhomi, H., Grati Affes, T., Nait Mohamed, S., Aidi Wannes, W., & Saidani-Tounsi, M. (2022). Optimizing ethanol extraction of rosemary leaves and their

- biological evaluations. *Journal of Exploratory Research in Pharmacology*, 7(2), 85–94. <https://doi.org/10.14218/JERP.2022.00002>
27. Zeghad, N., & Merghem, R. (2016). Antioxidant activity of flavonoids isolated from *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Plant Science & Research*, 3(1), 142. <https://www.opensciencepublications.com/fulltextarticles/JPSR-2349-2805-3-142.pdf>
28. Megateli, S., & Krea, M. (2018). Enhancement of total phenolic and flavonoids extraction from *Rosmarinus officinalis* L. using electromagnetic induction heating (EMIH) process. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 24(5), 889–897. <https://doi.org/10.1007/s12298-018-0585-5>
29. Corbu, V. M., Gheorghe-Barbu, I., Marinas, I. C., Avramescu, S. M., Pecete, I., Geană, E. I., & Chifiriuc, M. C. (2022). Eco-friendly solution based on *Rosmarinus officinalis* hydro-alcoholic extract to prevent biodeterioration of cultural heritage objects and buildings. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19), 11463. <https://doi.org/10.3390/ijms231911463>
30. Rawel, H. M., Rohn, S., Kruse, H. P., & Kroll, J. (2002). Structural changes induced in bovine serum albumin by covalent attachment of chlorogenic acid. *Food Chemistry*, 78(4), 443–455. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00160-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00160-1)
31. Kim, W., Wang, Y., & Selomulya, C. (2024). Emerging technologies to improve plant protein functionality with protein–polyphenol interactions. *Trends in Food Science & Technology*, 147, 104469. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2024.104469>
32. Jakobek, L. (2015). Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. *Food Chemistry*, 175, 556–567. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.013>
33. Ozdal, T., Capanoglu, E., & Altay, F. (2013). A review on protein–phenolic interactions and associated changes. *Food Research International*, 51(2), 954–970. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.009>
34. Liu, F., Ma, C., Gao, Y., & McClements, D. J. (2020). Food-grade covalent complexes and their application as nutraceutical delivery systems. *Food Chemistry*, 318, 126489. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126489>
35. Berker, K. I., Güçlü, K., Tor, İ., & Apak, R. (2007). Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, bathophenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*, 1770(10), 1314–1323. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2007.06.010>
36. Zhang, X., Li, Y., Wang, Z., & Chen, H. (2024). Correlation between phenolic compounds and antioxidant activities in plant extracts: A comprehensive analysis of TPC, TFC, DPPH, ABTS, and FRAP. *Frontiers in Nutrition*, 11, Article 1327164. <https://doi.org/10.3389/fnut.2024.1327164>
37. Lim, Y. Y., & Quah, E. P. L. (2007). Antioxidant properties of different cultivars of *Pandanus amaryllifolius* Roxb. *Food Chemistry*, 102(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.041>