

بررسی تأثیر شرایط استخراج و ترسیب بر راندمان و خواص عملکردی ایزوله پروتئینی کلزا

جلال محمدزاده^{۱*}، علیرضا قدس ولی^۲

۱- استادیار علوم و صنایع غذایی بخش تحقیقات فنی و مهندسی کشاورزی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان، سازمان

تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران

۲- دانشیار علوم و صنایع غذایی، بخش تحقیقات فنی و مهندسی کشاورزی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان، سازمان

تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۴/۰۶/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۴/۱۹)

چکیده

میزان زیاد پروتئین و ترکیب مناسب و متوازن اسیدهای آمینه ضروری در کنجاله کلزا سبب اهمیت بیشتر این دانه روغنی در سال‌های اخیر شده است. حضور ترکیبات پروتئینی مختلط در کنجاله سبب شده استخراج پذیری و ترسیب پروتئین‌های آن تابعی از عامل pH باشد که علاوه بر میزان راندمان می‌تواند بر رفتار عملکردی پروتئین نیز تأثیر گذار باشد. لذا در این تحقیق از روش سطح پاسخ و طرح مرکب مرکزی به منظور بررسی تأثیر متغیرهای مستقل pH قلیایی استخراج پروتئین (۱۰-۱۲) و pH اسیدی ترسیب پروتئین (۴/۵-۶/۵) بر راندمان و خواص عملکردی ایزوله پروتئینی کلزا (رقم هایولا) استفاده شد. ضرایب تبیین مدل‌های رگرسیونی برازش شده برای راندمان، جذب آب، جذب چربی، شاخص حلالیت، ظرفیت امولسیون کنندگی و ظرفیت کف‌کنندگی به ترتیب ۰/۹۸، ۰/۹۴، ۰/۹۱، ۰/۹۲، ۰/۹۰ و ۰/۹۳ به دست آمد. نتایج نشان داد اثر متغیرهای pH استخراج و pH ترسیب پروتئین بر راندمان، جذب آب و چربی معنی دار و شاخص‌های حلالیت، امولسیون کنندگی و کف‌کنندگی فقط متأثر از pH استخراج بودند. شرایط بهینه استخراج و ترسیب با بیشینه راندمان و خواص عملکردی ایزوله پروتئینی در pH استخراج برابر ۱۱/۹۳ و pH ترسیب برابر ۵/۵۷ به دست آمد. در این شرایط مقدار راندمان، جذب آب، جذب چربی، شاخص حلالیت، ظرفیت امولسیون کنندگی و ظرفیت کف‌کنندگی به ترتیب ۸۹، ۲۲۵، ۱۸۵، ۴۱، ۶۴ و ۱۶۵ درصد بود.

کلید واژگان: ایزوله پروتئینی، خواص عملکردی، روش سطح پاسخ، کلزا/ کانولا

۱- مقدمه

افزایش جمعیت، بهبود سطح تغذیه و افزایش مصرف پروتئین-های گیاهی، تکاپو جهت دستیابی به منابع جدید پروتئینی را افزایش داده است. یکی از این منابع پروتئینی دانه روغنی کلزا می‌باشد که کشت آن در سال‌های اخیر در بسیاری از مناطق کشور، به خصوص استان‌های گلستان و مازندران گسترش یافته است. این دانه بعد از سویا و نخل روغنی مقام سوم را در تأمین روغن نباتی و مقام پنجم را در تأمین پروتئین جهان به خود اختصاص داده است [۱]. کنجاله کلزا دارای ۴۳-۳۸٪ پروتئین بوده و از نظر کیفی پروتئین‌های آن ترکیب مناسبی از اسیدهای آمینه ضروری و غیرضروری می‌باشد، بطوریکه مقدار اسیدهای آمینه لیزین، متیونین، سیستئین، ترئونین و تریپتوفان آن با دانه‌های غلات قابل مقایسه می‌باشند [۱ و ۲].

علاوه بر نقش پروتئین‌ها در تغذیه انسان، در بسیاری از فرآورده‌های غذایی دارای نقش‌های عملگرا و ویژه می‌باشند به طوری که بخش قابل توجهی از ویژگی‌های عملکردی مواد غذایی مربوط به پروتئین‌ها می‌باشد به عبارت دیگر کاربرد یک پروتئین گیاهی به عنوان جزئی از مواد تشکیل دهنده یک ترکیب غذایی به ویژگی‌های عملکردی آن وابسته است. خصوصیات از قبیل ظرفیت جذب آب، جذب چربی، شاخص حلالیت نیتروژن، قدرت امولسیون کنندگی و ظرفیت کف-کنندگی در واقع معیاری جهت پیشگویی رفتار پروتئین‌ها در انواع فرآورده‌های غذایی می‌باشد [۳]. استخراج پروتئین از کنجاله کلزا و خواص فیزیکی شیمیایی آن به عوامل مختلفی از قبیل روش استخراج، اندازه ذرات، نسبت حلال به کنجاله، زمان و درجه حرارت استخراج، pH و قدرت یونی محلول بستگی دارد [۴]. از میان عوامل فوق pH (در مراحل استخراج و ترسیب پروتئین) از اهمیت و حساسیت بیشتری برخوردار است [۵]. در ارتباط با تاثیر شاخص pH بر رفتار عملکردی ایزوله پروتئینی کلزا گزارش‌ها بسیار محدود است. این عامل به علت تاثیر بر آرایش ساختمانی و تغییر شکل پروتئین و نحوه توزیع بار پروتئین، قابلیت تغییر و اثر گذاری بر خواص عملکردی پروتئین را نیز دارا می‌باشد [۶ و ۷].

در بررسی شرایط استخراج پروتئین کلزا از برخی ارقام کانادایی معلوم شد خواص عملکردی پروتئین کلزا نسبت به عامل pH حساس تر بوده و شرایط pH استخراج و رسوب پروتئین می‌تواند به عنوان یک عامل قابل کنترل جهت تغییر

خواص ایزوله پروتئینی کلزا عمل نماید [۵]. ژو و دیوسدی^۱ ایزوله پروتئینی با مقدار پروتئین بالاتر از ۹۰٪ تهیه کردند که از نظر خصوصیات عملکردی دارای اندیس حلالیت خوب و خاصیت کف زایی بالا (حتی بالاتر از سفیده تخم مرغ) و خاصیت امولسیون کنندگی متوسط بود. آنان دریافتند حلالیت و قدرت کف کنندگی پروتئین تحت تاثیر اسید فیتیک بوده و جدا شدن فیتات‌ها نیز به مقدار زیادی به تغییرات pH بستگی دارد [۹]. نتایج بررسی دیگری در رابطه با تاثیر pH بر خواص عملکردی پروتئین کلزا نشان داد جذب روغن، ظرفیت امولسیون کنندگی و کف کنندگی ایزوله پروتئینی رسوب کرده در pH برابر ۵/۸ نسبت به پروتئین رسوب کرده در pH برابر ۳/۶ بالاتر بود [۲]. بررسی رفتار اجزاء عمده ایزوله پروتئینی کلزا (گلوبولین^۲ و آلبومین^۳) نشان داد، گلوبولین‌ها از پایداری و ظرفیت امولسیون کنندگی بالاتری نسبت به جزء آلبومینی و ایزوله رسوبی کلزا برخوردار هستند [۸]. لذا در این تحقیق به بررسی تاثیر شرایط بهینه استخراج و ترسیب بر راندمان و خصوصیات عملکردی ایزوله پروتئینی کلزا پرداخته شد تا نتایج قابل توجهی در زمینه کاربرد ایزوله پروتئینی کلزا در فرآورده‌های غذایی مختلف به دست آید.

۲- مواد و روش‌ها

نمونه کلزا مورد بررسی رقم غالب منطقه استان گلستان (رقم هایولا^۴) بود که با مدیریت زراعی مناسب و کنترل شده در ایستگاه تحقیقاتی گرگان کشت شد. نمونه‌ها پس از جداسازی ناخالصی‌ها و بوجاری، تا رطوبت ۸٪ خشک شدند. دانه‌ها پوست گیری و سپس توسط حلال هگزان آمونیاکی (۱ درصد محلول آمونیاکی در هگزان صنعتی) به نسبت ۱ به ۵ (وزنی /حجمی دانه: حلال) در دستگاه سوکسله به مدت ۱۸ ساعت روغن کشی شدند. کنجاله حاصله پس از شستشو با اتانول، با استفاده از خشک کن کابینتی در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد خشک و توسط آسیاب خرد شدند به طوری که ذرات حاصل از الک (با اندازه ۶۰ میکرون) قابل عبور باشند (لازم به ذکر است حلال آمونیاکی سبب جداسازی بهتر گلوکوزینولات و فیتات هادر مراحل بعدی می‌گردند) [۱۰].

1. Xu & Diosady
2. Globulin
3. Albumin
4. Hayola

۲-۱- استخراج پروتئین در شرایط قلیایی

در این مرحله ۵۰ گرم پودر کنجاله کلزا را در محلول قلیایی آبکی (حاصل از سود یک نرمال، به نسبت ۱۸ به ۱ آب و کنجاله) مخلوط و سپس pH مخلوط در طیف قلیایی pH (۱۰-۱۲) تنظیم گردید. به مخلوط حاصله ۰/۱ درصد سولفیت سدیم (Na_2SO_3)، ۴/۳۸ گرم NaCl و ۱/۵ گرم SDS (سدیم دودسیل سولفات) افزوده و به مدت نیم ساعت در دمای اتاق و به آرامی بهم زده شد (ترکیبات فوق سبب جداسازی باندهای فنلی و فیتات‌ها می‌گردد) سپس بخش نامحلول حاصل، توسط سانتریفیوژ ($4000 \times g$ به مدت ۱۵ دقیقه) از فاز محلول جدا گردید [۹ و ۱۰].

۲-۲- مرحله رسوب گذاری پروتئین در شرایط

اسیدی

فاز محلول حاصل از مرحله قبلی، توسط اسید کلریدریک ۶ مولار به محدوده نقطه ایزوالکتریک در pH اسیدی رسانده شد و طیف pH (۶/۵-۴/۵) مورد بررسی قرار گرفت. سپس پروتئین رسوب کرده از هر شرایط در $4000 \times g$ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و جهت خلوص بالاتر ۵ مرتبه با آب مقطر شستشو و صاف گردید. پروتئین رسوبی حاصل در شرایط آن تحت خلاء در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد خشک و سپس آسیاب شد [۱۰].

۲-۳- آزمایش های فیزیکی و شیمیایی دانه و

کنجاله کلزا

ترکیبات شیمیایی نمونه‌ها (دانه و کنجاله کلزا) با استفاده از روش‌های AOAC اندازه گیری شد [۱۱]. برای تعیین رطوبت از آن ۱۰۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳ ساعت، تعیین چربی از روش سوکسله، تعیین پروتئین از روش کلدال ($6/25 \times N$) [۱۱]، مقدار فیبر خام کنجاله [۱۱]، مقدار فیتات براساس روش تیتراسیون فبلز^۹ [۱۲] و میزان گلوکوزینولات طبق روش وتر و یانگ^۶ [۱۳]، اندازه‌گیری شد.

۲-۴- اندازه‌گیری خواص عملکردی پروتئین

۲-۴-۱- ظرفیت جذب آب

۲ گرم نمونه پروتئینی با ۱۶ میلی لیتر آب مقطر با استفاده از ورتکس به مدت ۳۰ ثانیه هر ۱۰ دقیقه یکبار برای مدت یک ساعت مخلوط شد. در مرحله بعد به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت $2000 \times g$ سانتریفیوژ شد. ظرفیت جذب آب بر حسب درصد افزایش وزن نمونه اندازه گیری شد [۵].

۲-۴-۲- ظرفیت جذب چربی

۲ گرم نمونه پروتئینی با ۱۲ میلی لیتر روغن کلزا با استفاده از ورتکس به مدت ۳۰ ثانیه هر ۵ دقیقه یکبار برای مدت ۳۰ دقیقه مخلوط شد. در مرحله بعد به مدت ۲۵ دقیقه با سرعت $1600 \times g$ سانتریفیوژ شد. ظرفیت جذب روغن بر حسب درصد افزایش وزن نمونه اندازه گیری شد [۵].

۲-۴-۳- اندیس حلالیت نیتروژن

۵ گرم از نمونه را در یک بشر ۴۰۰ میلی لیتری ریخته و با ۲۰۰ میلی لیتر آب مقطر مخلوط گردید. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۵۰۰ دور، سانتریفوژ و از مایع رویی ۵ میلی لیتر برداشته و مقدار نیتروژن آن براساس روش کلدال، محاسبه گردید [۱۰].

$100 \times (\text{نیتروژن کل} / \text{نیتروژن محلول در آب}) = \%$ حلالیت نیتروژن

۲-۴-۴- ظرفیت امولسیون کنندگی

۳ گرم ایزوله پروتئینی با ۷۵ میلی لیتر آب برای مدت ۳۰ ثانیه کاملاً مخلوط شده و سپس ۲۵ میلی لیتر روغن ذرت افزوده و مجدداً برای ۱ دقیقه روی هم زن مغناطیسی به آرامی دوباره مخلوط گردید. سپس به مدت ۳ دقیقه با استفاده از دستگاه اولترا توراکس با دور ۵۰۰۰ rpm هم زده شد. امولسیون حاصل به مدت ۲ دقیقه در $1000 \times g$ سانتریفیوژ گردید (ارتفاع امولسیون با استفاده از خط کش مدرج اندازه گیری شد) [۸].

$100 \times \frac{\text{ارتفاع لایه امولسیفیه پس از سانتریفیوژ}}{\text{ظرفیت امولسیون کنندگی}}$

ارتفاع کل محلول قبل از سانتریفیوژ

۲-۴-۵- قدرت کف کنندگی

برای تعیین ظرفیت کف کنندگی از محلول ۳ درصدی ایزوله در آب مقطر استفاده شد. ۵۰ میلی لیتر از محلول حاصل به سرعت به یک استوانه مدرج ۲۵۰ میلی منتقل و حجم محلول قبل از هم زدن ثبت شد. در ادامه محلول به مدت ۲ دقیقه با ورتکس با دور بالا (۳۰۰۰ rpm) هم زده شد و بلافاصله حجم محلول ثبت شد [۲].

$\frac{\text{حجم محلول قبل از هم خوردن}}{\text{حجم محلول بعد از هم خوردن}} = \text{ظرفیت کف کتدگی}$

حجم محلول قبل از هم خوردن

5. Febles

6. Wetter & youngs

۲-۵- تجزیه آماری طرح

در این تحقیق از روش سطح پاسخ با طرح مرکب مرکزی جهت یافتن اثر متغیرهای مستقل pH استخراج (۱۱، ۱۰ و ۱۲) و pH ترسیب (۵/۵، ۶/۵ و ۷/۵) برای تعیین شرایط بهینه استفاده شد. داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار (Expert Design) مدل سازی شده و منحنی‌های سطح پاسخ جهت بررسی رابطه میان پاسخ‌ها و متغیرهای مستقل رسم شد. داده‌های حاصل از آزمایش‌ها بر مدل چند جمله‌ای درجه دوم

برازش داده شد. کفایت مدل نیز با استفاده از R^2 ، R^2 اصلاح شده و R^2 پیشگویی مورد بررسی قرار گرفت.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- ترکیبات شیمیایی دانه و کنجاله کلزا

نتایج موجود در جدول ۱ برخی ویژگی‌ها کلزای مورد استفاده جهت تهیه ایزوله پروتئینی را نشان می‌دهد. مقدار پروتئین کنجاله ۴۳/۵ درصد بود لازم به ذکر است مقدار پروتئین کنجاله در ارقام مختلف در دامنه ۳۶-۴۵٪ می‌باشد [۸].

Table 1 Characteristics of seed and canola meal

Characteristic	Moisture%	Protein%	Oil%	Fiber%	Phytate%	Glucosinolate μmol/g
Whole Seed	9.5	25.2	39.3	12.1	3.24	6
Meal	8.8	43.5	0.1	4.9	4.87	11

جهت تعیین روند تغییرات و بررسی اثر هر یک از متغیرهای مستقل در ابتدا نیاز به تعیین مناسب ترین مدل جهت برازش داده های آزمون می‌باشد. به طور متداول جهت بررسی صحت مدل از ضریب تبیین R^2 ، R^2 اصلاح شده و آزمون عدم برازش استفاده می‌شود. همچنین معنی دار نبودن آزمون عدم برازش برای یک مدل بیانگر این است که مدل توانسته است به خوبی بر داده‌های مورد بررسی برازش شود. جدول تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که آزمون عدم برازش برای تمام صفات مورد اندازه‌گیری با ضریب اطمینان ۹۵ درصد معنی دار نبود.

مقدار فیبر و فیتات کنجاله نیز بدلیل پوست گیری دانه به مقدار چشم‌گیری کاهش یافته است. مقدار روغن دانه نیز با توجه به استحصال روغن توسط حلال مقدار آن در کنجاله به میزان ۰/۱٪ رسیده است. مقدار گلوکوزینولات نیز در دانه و کنجاله به ترتیب ۶ و ۱۱ میکرومول بر گرم بوده که بخوبی نشانگر آن است که رقم مورد نظر رقم دو صفر می‌باشد.

۳-۲- گزینش مدل مناسب و تجزیه مدل

برازش یافته

Table 2 Coded levels and actual values of the variables in central composite design

Variable Levels			Experimental results (Response)				
Run	pH Extraction	pH Sedimentaion	WA%	FA %	NSI%	EC%	FC%
1	10 (-1)	4.5 (-1)	195	165	30	46	138
2	12 (1)	5.5 (0)	225	190	41	64	165
3	11 (0)	6.5 (1)	215	176	37	58	147
4	11 (0)	5.5 (0)	221	180	38	60	150
5	10 (-1)	5.5 (0)	210	174	34	52	144
6	11 (0)	5.5 (0)	220	175	37	65	155
7	10 (-1)	6.5 (1)	207	169	34	50	140
8	11 (0)	4.5 (-1)	198	171	36	57	142
9	11 (0)	5.5 (0)	215	183	39	58	148
10	11 (0)	5.5 (0)	225	184	41	59	153
11	12 (1)	4.5 (-1)	201	181	38	59	155
12	12 (1)	6.5 (1)	220	184	38	61	160
13	11 (0)	5.5 (0)	217	179	39	63	157

برازش شد (جدول ۲). مقدار R^2 ، برای میزان راندمان، جذب آب، جذب چربی، شاخص حلالیت، ظرفیت امولسیون کنندگی

با توجه به نتایج به دست آمده از تحلیل واریانس مدل سطح پاسخ چند جمله ای درجه دوم گزینش و بر داده‌های پاسخ

۳-۳- بررسی اثر متغیرهای مستقل بر میزان

راندمان

نتایج تحلیل داده‌ها نشان داد pH استخراج و ترسیب به صورت خطی، اثرات متقابل بین آنها و اثر درجه دوم pH ترسیب بر تغییرات راندمان معنی دار است ($P < 0.001$).

و ظرفیت کف کنندگی ایزوله پروتئینی کلزا به ترتیب ۰/۹۸، ۰/۹۴، ۰/۹۱، ۰/۹۲، ۰/۹۰ و ۰/۹۳ به دست آمد. علاوه بر مقادیر R^2 ، R^2 اصلاح شده نیز برای بررسی صحت مدل استفاده شد که بالا بودن R^2 اصلاح شده در این تحقیق نشان می‌دهد که متغیر غیر معنی داری به مدل اضافه نشده است.

Table 3. Analysis of variance and coefficient estimates for second-order model

Source	DF	Protein Yield			Water absorption			Fat absorption		
		Coef	SS	$P_r > F$	Coef	SS	$P_r > F$	Coef	SS	$P_r > F$
Model	5	-388.6	490.2	0.0001	-332.8	1140.7	0.0004	42.9	530.4	0.0015
A: pH Ext	1	22	206.5	0.0001	27.9	192.6	0.0003	-24.5	368.1	0.0002
B: pH Sed	1	112.7	54	0.0002	125.6	384	0.0005	81.3	24	0.0149
A2	1	-0.25	.18	0.701	-1.4	5.8	0.475	1.5	6.5	0.379
B2	1	-8	179.2	0.0001	-12.4	427.9	0.0003	-6.9	134	0.003
AB	1	-1.9	14.82	0.0084	1.7	12.2	0.309	-0.25	0.25	0.859
Residual	7		7.8			71.2			51.8	
Lack of fit	3		4.18	0.34 ^{ns}		12	0.84 ^{ns}		1	0.99 ^{ns}
Pure error	4		3.6			59.2			50.8	
Cor total	12		498.1			1212			582.3	
R²		0.98			0.94			0.91		
R²-Adj		0.97			0.91			0.88		

Continued Table 3

Source	DF	Nitrogen Solubility Index			Emulsifying Capacity			Foaming capacity		
		Coef	SS	$P_r > F$	Coef	SS	$P_r > F$	Coef	SS	$P_r > F$
Model	5	-302.5	101.4	0.0013	-546.9	334.1	0.0019	200.3	730.3	0.0008
A: pH Ext	1	39.3	60.1	0.0003	80	216	0.0003	-55.9	560.6	0.0001
B: pH Sed	1	38.1	4.2	0.123	47.8	8.17	0.245	73	24	0.133
A2	1	-1.3	5.4	0.701	-3.2	29	0.0480	2.8	21.5	0.152
B2	1	-2.3	15.9	0.0865	-3.7	38.6	0.0288	-7.2	143.4	0.004
AB	1	-1	4	0.0112	-0.5	1	0.670	-0.75	2.25	0.619
Residual	7		9.5			35.5			58.3	
Lack of fit	3		0.69	0.95 ^{ns}		1.51	0.97 ^{ns}		5.19	0.93 ^{ns}
Pure error	4		8.8			34			53.20	
Cor total	12		110.92			369.6			7.78	
R²		0.92			0.90			0.93		
R²-Adj		0.88			0.86			0.89		

باز شدن برخی پروتئین‌ها) در pH حدود ۱۲ بالاتر می‌باشد. کومبای^v و همکاران نتایج مشابهی را گزارش کردند و بیان داشتند در pH های بالاتر از ۱۲ هیدرولیز قلیایی باندهای پپتیدی صورت گرفته که می‌تواند باعث شکافتگی غیر قابل کنترل در مولکول پروتئین و کاهش راندمان گردد [۱۴].

ارتباط بین متغیرها و راندمان می‌تواند بوسیله نمودارهای کنتور (تراز) و یا سه بعدی بهتر درک و شناسایی شود. با توجه به معنی دار بودن اثر درجه دوم pH ترسیب، وجود انحنا در نمودار رویه را می‌توان انتظار داشت (شکل ۱). در بررسی اثر pH استخراج به تنهایی با افزایش pH به سمت قلیایی پروتئین بیشتری از کنجاله جدا و حل شد، به عبارت دیگر استخراج پذیری پروتئین (به علت بار منفی زیاد و از تا

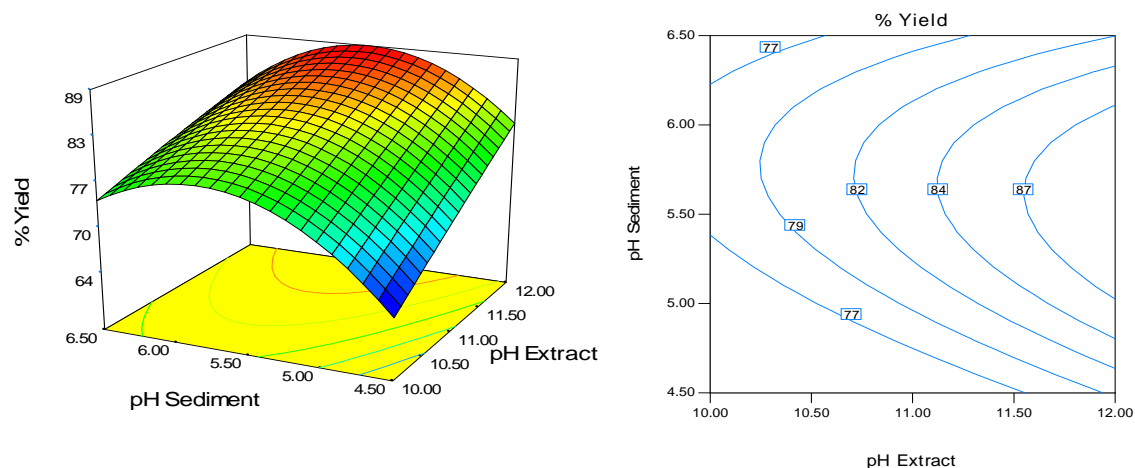


Fig. 1 Contour plot and 3D response surface curves for the effect of extraction and precipitation conditions on the protein yield

در رسوب پروتئین در pH برابر ۵ گزارش کردند که به نتایج این تحقیق نزدیک است [۱۵].

۳-۴- بررسی اثر متغیرهای مستقل بر میزان جذب آب

اثر خطی pH استخراج و ترسیب و اثر درجه دوم pH ترسیب بر میزان جذب آب معنی دار بود (جدول ۲). میزان جذب آب با افزایش pH استخراج افزایش یافته و کمترین مقدار جذب آب در pH استخراج برابر ۱۰ و ترسیب معادل ۴/۵ حاصل شده است (شکل ۲). در مورد عامل pH اسیدی با افزایش آن مقدار جذب آب روند افزایشی داشته و از pH حدود ۶ به صورت آهسته کاهش یافته است. ملاحظه می‌گردد روند تاثیر pH استخراج و ترسیب بر میزان جذب آب تقریباً مشابه اثر آن بر راندمان می‌باشد. pH محیط به علت تغییراتی که در میزان گروه‌های باردار، در سطح پروتئین به وجود می‌آورد به شکل مؤثری بر ویژگی‌های جذب آب پروتئین‌ها می‌تواند تأثیرگذار باشد [۶].

در بررسی عامل pH اسیدی، به نظر می‌رسد در pH کمتر از ۵/۵ (حدود نقطه ایزوالکتریک) بدلیل مثبت بودن بار پروتئین ذرات با نیروی دافعه از یکدیگر دور می‌شوند و در pH بالای ۵/۵ بدلیل منفی بودن بار پروتئین، ذرات پروتئین تحت تأثیر نیروی دافعه از یکدیگر دور و بصورت محلول باقی مانده و کمتر رسوب می‌کنند. بنابراین، در pH حدود ۵/۵ مقدار پروتئین با اختلاف معنی‌داری بالاتر قرار گرفته است. این در حالی است که ژو و دیوسدی بالاترین مقدار پروتئین را در pH برابر ۶/۵ گزارش کردند [۹]. این اختلاف در نتایج می‌تواند ناشی از تأثیر رقم و شرایط منطقه‌ای رشد کلزا باشد. لازم به ذکر است با افزایش pH استخراج و ترسیب تا حدود ۵/۵ راندمان بطور معنی‌داری افزایش یافته و از آن به بعد علی‌رغم افزایش pH استخراج، راندمان کاهش یافت. جرژوا و همکاران نیز در بهینه‌سازی شرایط تهیه ایزوله پروتئینی کانولا بیشترین راندمان را pH استخراج برابر ۱۲ و

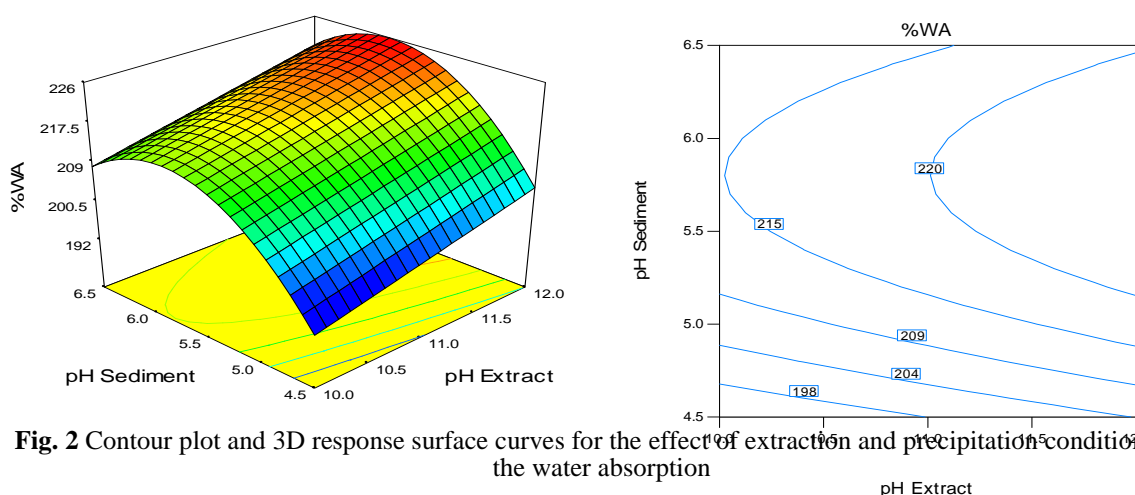


Fig. 2 Contour plot and 3D response surface curves for the effect of extraction and precipitation conditions on the water absorption

زنجیره‌های جانبی هیدروکربنی روغن و همچنین شکل فضایی پروتئین نسبت داده شده است. مقدار جذب چربی پروتئین کلزا در دامنه ۱۸۲٪-۱۷۱٪ متغیر می‌باشد که مقدار آن مناسب و قابل رقابت با پروتئین سویا (۱۷۵٪) است. بنابراین جهت کاربرد در فرآورده‌های گوشتی قابل توصیه است [۳ و ۵].

۳-۶- بررسی اثر متغیرهای مستقل بر میزان شاخص حلالیت

نظر به اینکه در بسیاری از سیستم‌های غذایی وجود پروتئین به صورت محلول ضروری است لذا خصوصیت حل شدن پروتئین از اهمیت بالایی برخوردار است. نتایج جدول تحلیل واریانس داده‌ها نشان داد حلالیت پروتئین تحت تاثیر عامل pH قلیایی استخراج می‌باشد و تاثیر عامل pH ترسیب و اثر متقابل آنها بر حلالیت معنی دار نیست. با افزایش pH قلیایی استخراج حلالیت به طور معنی داری افزایش می‌یابد اما با افزایش pH ترسیب حلالیت روند افزایشی داشته خود را حفظ کرده و از pH ۵/۵ به بعد کاهش نشان داده است. بطوریکه بیشترین حلالیت در pH استخراج ۱۲ و pH ترسیب حدود ۵/۵ حاصل شده است (شکل ۴). حلالیت یکی از خواص عملکردی اصلی پروتئین است که کارایی مواد پروتئینی را کنترل می‌کند و می‌تواند بر سایر خواص عملکردی مانند خواص امولسیون، کف زایی و ژلاتیناسیون نیز موثر باشد [۱۷]. معمولا میزان حلالیت پروتئین‌ها وابسته به تغییرات pH بوده و در pH های قلیایی و اسیدی به ترتیب به دلیل افزایش بار منفی ناشی از گروه‌های کربوکسیل و بار مثبت گروه‌های آمینی، نیروی دافعه الکترواستاتیکی بین اسیدهای آمینه با بارهای هم نام افزایش و در نتیجه حلالیت بیشتر می‌شود [۲ و ۵]. اندیس حلالیت نیترژن ایزوله پروتئینی کلزا با توجه به نتایج بدست آمده بین ۴۰-۳۴٪ بود که بسیار مطلوب و مناسب می‌باشد. هر قدر میزان حلالیت پروتئین بیشتر باشد قابلیت تلفیق آن با مواد غذایی بیشتر و راحت‌تر بوده و در نتیجه ارزش غذایی آن نیز بیشتر می‌شود [۱۸].

جذب آب را باید مهمترین خصوصیت فیزیکی پروتئین‌ها دانست. این پدیده نه تنها بر ساختمان فیزیکی و خصوصیات فرایندی ماده غذایی حاوی پروتئین اثر می‌گذارد، بلکه از نظر فساد ماده غذایی (در فرآورده هایی از قبیل نان‌ها، کیک‌ها، ماکارونی و قنادی) و در مورد مواد غذایی غلیظ و چسبنده (سوپ‌ها، خمیرها) به جهت حبس و نگهداری آب بسیار حائز اهمیت است [۷]. ظرفیت جذب آب در مواد غذایی مختلف به ترکیب اسیدهای آمینه، آرایش فضایی پروتئین، میزان آبدوستی و آبگریزی پروتئین بستگی دارد [۵]. جذب آب ایزوله پروتئینی کلزا در شریط pH استخراج برابر ۱۲ و pH ترسیب برابر ۵/۵ به ۲۲۵٪ رسید که با مقدار جذب آب گزارش شده توسط مهاجان و دوآ^{۱۰} (۲۲۰ درصد) مطابقت دارد [۱۶].

۳-۵- بررسی اثر متغیرهای مستقل بر میزان جذب چربی

در بسیاری از مواد غذایی واکنش بین پروتئین و چربی بسیار حائز اهمیت است. بنابراین جذب چربی بالا به عنوان یکی دیگر از خواص عملکردی پروتئین‌ها حائز اهمیت می‌باشد. نتایج نشان داد اثر خطی pH استخراج و ترسیب و اثر درجه دوم pH ترسیب بر میزان جذب چربی معنی دار بود ($P < 0.001$)، به طوری که با افزایش pH استخراج میزان جذب چربی افزایش یافته است. با توجه به وجود انحنا در نمودار رویه سطح، بیشترین میزان جذب چربی در pH ترسیب ۵/۵ تا ۶ حاصل شده است و افزایش عامل pH استخراج در محدوده مذکور تاثیر مثبتی بر میزان جذب نداشته است (شکل ۳).

خاصیت جذب چربی یک پدیده فیزیکی است. ترکیبات و بیوپلیمرهای موجود در ایزوله پروتئینی کلزا باعث محبوس شدن و به دام انداختن قطرات روغن در داخل خود می‌شوند. این پدیده به اثر تداخلی زنجیره‌های غیر قطبی پروتئین با

10. Mahajan & Dua

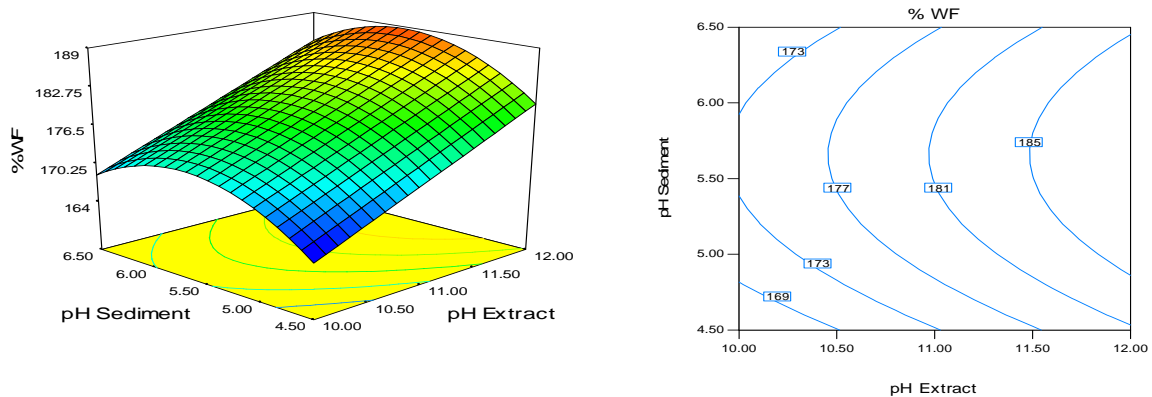


Fig 3 Contour plot and 3D response surface curves for the effect of extraction and precipitation conditions on the fat absorption

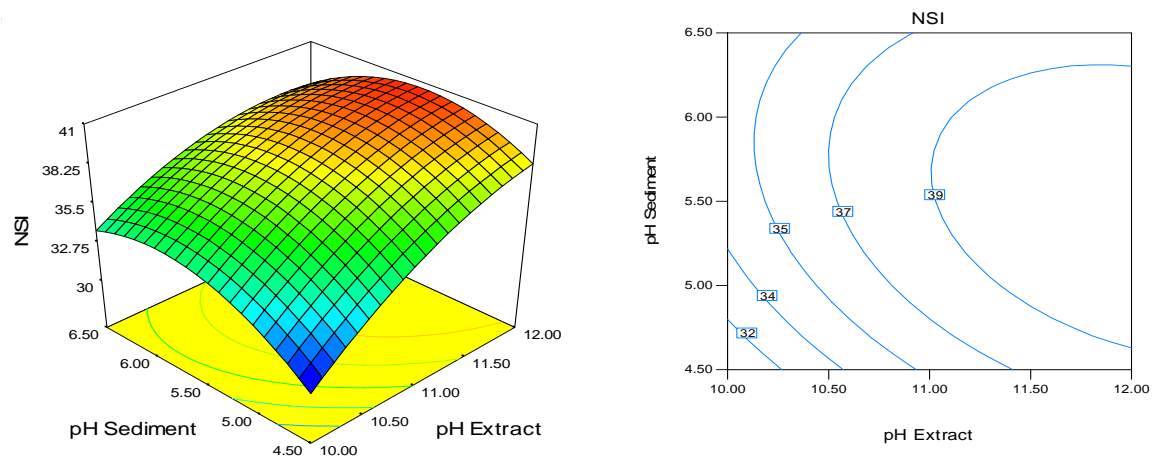


Fig4 Contour plot and 3D response surface curves for the effect of extraction and precipitation conditions on the nitrogen solubility index

پروتئین می‌باشد. در pH های قلیایی، هیدروفیلی سطحی و حلالیت به میزان زیادی افزایش می‌یابد و باعث افزایش ظرفیت امولسیون کنندگی شده است. [۸ و ۱۹]. لازم به ذکر است تشکیل کمپلکس‌های غیرمحلول توسط اسید فیتیک در هنگام استخراج پروتئین کلزا موجب کاهش تعداد مولکول‌های فعال سطحی در ایزوله می‌گردد. لذا جدا شدن فیتات‌ها به مقدار زیادی به تغییرات pH بستگی دارد و بر اساس نتایج ژو و دیوسدی در استخراج قلیایی با $pH > 11$ فیتات‌ها براحتی از پروتئین جدا می‌شوند که می‌تواند دلیل دیگری بر تاثیر معنی دار pH استخراج بر ظرفیت امولسیون کنندگی پروتئین کلزا باشد [۹]. لذا می‌توان با کنترل pH استخراج، ایزوله‌های پروتئینی با قابلیت امولسیون کنندگی بالا به منظور کاربرد در فرآورده‌های گوشتی، انواع نان، کیک‌ها و سوپ‌ها تهیه نمود [۷]. لی و همکاران نیز در بررسی خواص عملکردی ایزوله پروتئینی سویا در روش های مختلف استخراج تاکید کردند که

۳-۷- بررسی اثر متغیرهای مستقل بر ظرفیت

امولسیون کنندگی

ظرفیت امولسیون کنندگی یکی دیگر از خواص عملکردی پروتئین‌ها بوده که در واقع بیانگر میزان روغنی است که می‌تواند توسط مقدار مشخصی پروتئین بصورت امولسیون در آید. نتایج نشان داد اثر خطی pH استخراج ($P < 0.001$) و اثر درجه دوم pH استخراج و pH ترسیب ($P < 0.05$) بر ظرفیت امولسیون کنندگی ایزوله پروتئینی کلزا معنی دار می‌باشد. با افزایش pH استخراج تا ۱۱/۵ ظرفیت امولسیون کنندگی به طور چشم گیری افزایش یافته است. همچنین در pH های ترسیب کمتر از ۵/۵ و بیشتر از ۶ نیز فعالیت امولسیون کنندگی پایین است (شکل ۵). ظرفیت امولسیون کنندگی ایزوله پروتئینی کلزا تابع تغییرات pH بوده که این وابستگی به دلیل اثر pH بر تعادل هیدروفوب-هیدروفیلی

همه خواص عملکردی پروتئین از جمله امولسیون کنندگی و سطح هیدروفوب آن به طور قابل توجهی به pH محیط

استخراج بستگی دارد که با نتایج این تحقیق همسو است [۲۰].

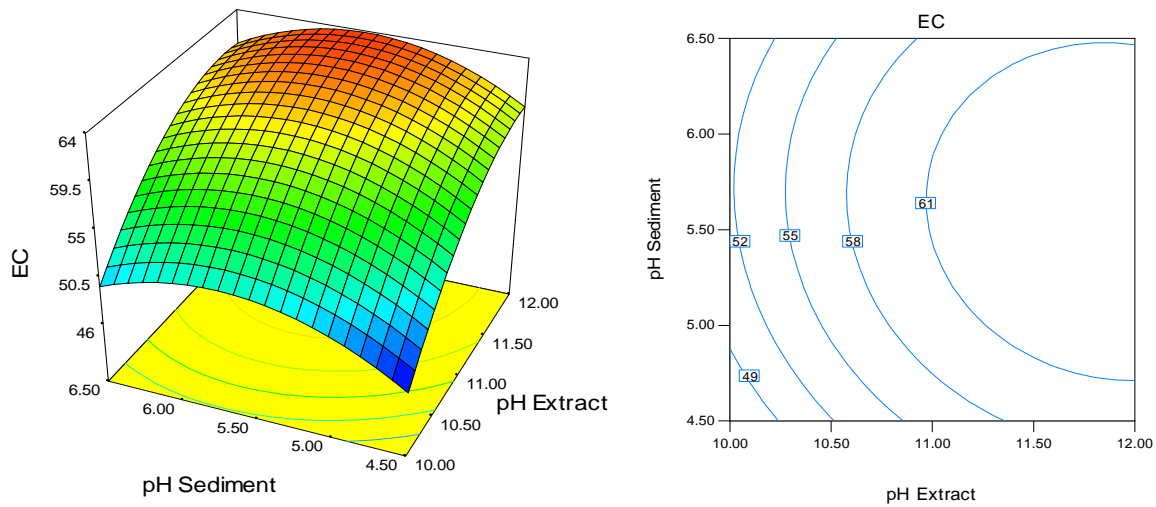


Fig 5 Contour plot and 3D response surface curves for the effect of extraction and precipitation conditions on the emulsifying Capacity

افزایش یافته است. افزایش حلالیت پروتئین در pH قلیایی احتمالاً به انعطاف پذیری پروتئین کمک کرده و مانع بر هم کنش‌های هیدروفوب-هیدروفوب بین مولکول‌های پروتئین می‌گردد [۱۷]. به طور کلی تغییرات ظرفیت کف کنندگی هم جهت و متناسب با تغییرات حلالیت پروتئین می‌باشد. با توجه به معنی دار بودن اثر درجه دوم pH ترسیب و وجود انحنای در منحنی رویه پاسخ، تعیین میزان بیشینه پاسخ در محدوده انتخابی امکان پذیر بوده که در حدود pH برابر ۵/۵ می‌باشد (شکل ۶).

۳-۸- بررسی اثر متغیرهای مستقل بر ظرفیت کف کنندگی

نتایج تحلیل واریانس داده‌ها نشان داد، pH استخراج و با شدت کمتری اثر درجه دوم pH ترسیب بر ظرفیت کف کنندگی پروتئین تاثیر معنی داری دارند. ضرایب متغیرهای مستقل نیز حاکی از آن بود که pH استخراج تاثیر زیادی بر تغییرات کف کنندگی پروتئین دارد. به طوری که در pH قلیایی بالاتر از ۱۱ ظرفیت کف کنندگی به طور چشم گیری

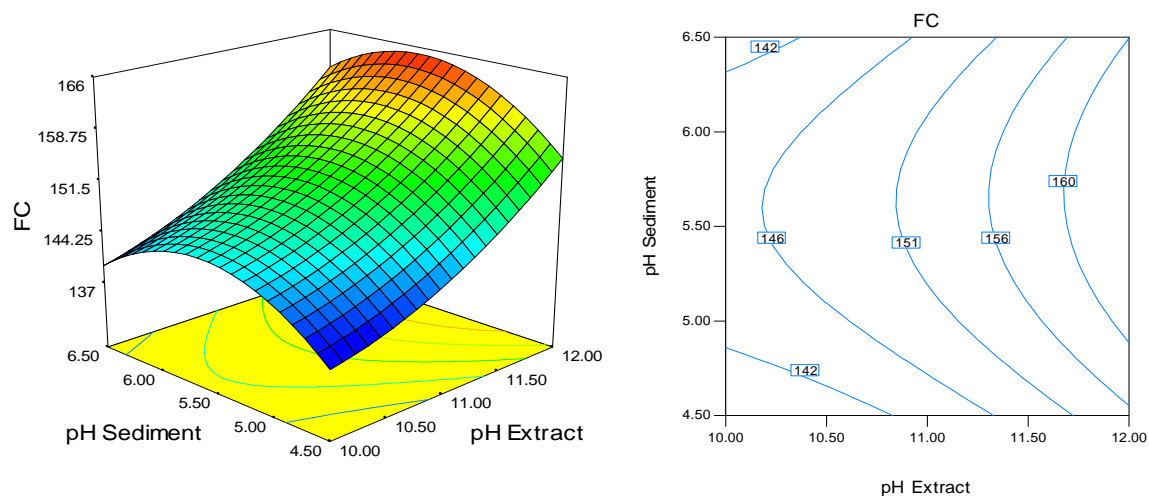


Fig 6 Contour plot and 3D response surface curves for the effect of extraction and precipitation conditions on the foaming Capacity

عملکردی حلالیت، ظرفیت امولسیون کنندگی و کف کنندگی ایزوله پروتئینی کلزا حساسیت بیشتری نسبت به pH قلیایی استخراج داشتند و pH ترسیب اثر معنی داری بر آنها نداشت. ارتباط مثبت بین شرایط بیشینه راندمان و خواص عملکردی پروتئین می تواند استفاده از عامل های pH استخراج و pH ترسیب را جهت تغییر و بهبود خواص عملکردی ایزوله پروتئینی کلزا با توجه به کاربرد آن، فراهم کند.

۵- منابع

- [1] Shahidi, F. 1990. Canola and rapeseed production. Chemistry, Nutrition and Processing Technology. Van Nostrand Reinhold New York. pp: 291-350.
- [2] Dong, X. Y., Guo, L. L., Wei, F., Li, J. F., Jiang, M. L. & Chen, H. 2011. Some characteristics and functional properties of rapeseed protein prepared by ultrasonic, ultrafiltration and isoelectric precipitation. Journal Science Food Agriculture, 91: 1488-1498.
- [3] Wu, J. & Muir, A. D. 2008. Comparative structural, emulsifying, and biological properties of 2 major canola proteins, cruciferin and napin. Journal of Food Science, 73: 210-16.
- [4] Gerzhova, A., Mondor, M., Benali, M. & Aider, M. 2015. A comparative study between the electro-activation technique and conventional extraction method on the extractability, and physicochemical properties of canola protein concentrates and isolates. Food Bioscience, 11: 56-71.
- [5] Wajira, A., Manamperi, R., Dennis, P. & Chang, S. 2011. Effects of protein separation condition on the functional and thermal properties of canola protein isolates. Journal of Food Science, 76: 266-273.
- [6] Ragaba, D. M. & Babiker, E. E. 2004. Fractionation, solubility and functional properties of cowpea proteins as affected by pH and salt concentration. Food Chemistry, 84: 207-212.
- [7] Singh, P. Kumar, R. & Bawa, A.S. 2008. Functional and Edible uses of soy protein products. Comprehensive reviews in food science and food safety, 7: 14-28.
- [8] Siong, H., Rodney, J. & Christopher, L. 2014. Emulsifying properties of protein extracted from Australian canola meal.

کف در مواد غذایی شامل پراکنندگی حباب های گاز در داخل یک فاز مایع و یا یک فاز نیمه جامد پیوسته است. خاصیت کف کنندگی معمولا در ایجاد خصوصیات رئولوژیکی مطلوب در مواد غذایی مانند بافت نان، کیک های بدون روغن و بستنی نقش اساسی دارد [۱۶]. پروتئین ها با کاهش کشش سطحی و حفظ پایداری حباب به علت ایجاد فیلم چسبنده در سطح میانی آب-هوا می توانند نقش مهمی در تشکیل کف ایفا کنند. مهم ترین عاملی که سبب می شود پروتئین در شرایط مختلف مانند pH به عنوان یک عامل کف زای مطلوب فعالیت کند، قابلیت جذب سریع آن در سطح بین آب-هوا و همچنین تغییرات ساختاری سریع در پروتئین می باشد [۱۸].

۳-۹- بهینه یابی و اعتبار سنجی مدل

شرایط بهینه استخراج و ترسیب ایزوله پروتئینی با استفاده از روش بهینه یابی عددی نرم افزار مذکور در شرایط در pH استخراج برابر ۱۱/۹۳ و pH ترسیب برابر ۵/۵۷ با بیشینه مقادیر راندمان جذب آب، جذب چربی، شاخص حلالیت نیتروژن، فعالیت امولسیون و ظرفیت کف کنندگی به ترتیب ۸۹، ۲۲۵، ۱۸۵، ۴۱، ۶۴ و ۱۶۵ درصد به دست آمد. جهت تصدیق مدل، آزمایشات تاییدی نقاط بهینه در سه تکرار با اندازه گیری خواص عملکردی فوق صورت گرفت. متوسط بیشینه ی مقادیر جذب آب، جذب چربی، شاخص حلالیت نیتروژن، فعالیت امولسیون و ظرفیت کف کنندگی به ترتیب ۹۰/۱، ۲۲۰، ۱۸۳، ۴۰، ۶۵ و ۱۷۰ درصد حاصل شد که درجه تطبیق بالای مقادیر تجربی را با مقادیر پیش بینی شده نشان می دهد.

۴- نتیجه گیری

با توجه به طرح توسعه کشت دانه های روغنی بخصوص کلزا در کشور ما توجه به مسائل صنایع تبدیلی این محصول و استفاده بهینه از ضایعات و کنجاله آن از جایگاه ویژه ای برخوردار می باشد. نتایج نشان داد روش سطح پاسخ می تواند به طور موفقیت آمیزی در بهینه سازی عامل های تاثیر گذار pH استخراج و ترسیب بر راندمان و خصوصیات عملکردی پروتئین کلزا به کار رود. مدل حاصل بیانگر تناسب و ضریب اطمینان بالای مدل در پیش بینی پاسخ ها در شرایط مختلف بود. بر این اساس شرایط بهینه pH استخراج برابر ۱۱/۹۳ و pH ترسیب برابر ۵/۵۷ به دست آمد. همچنین خواص

- [15] Gerzhova, A., Mondor, M., Benali, M. & Aider, M. 2016. Study of total dry matter and protein extraction from canola meal as affected by the pH, salt addition and turbidimetry analysis to optimize the extraction conditions. *Food Chemistry*, 201: 243-252
- [16] Mahajan, A. & Dua, S. 2001. Functional properties of rapeseed protein isolate. *Journal Food. Science and Technology*, 32 : 162-165.
- [17] Siong, H., Rodney, J. & Christopher, L. 2014. Gelling and foaming properties of protein fraction and protein isolate extracted from Australian canola meal. *Food Research International*, 62: 819-828.
- [18] Lawal, O. S. 2004. Functionality of African locust bean protein isolate: effects of pH, ionic strength and various protein concentration. *Food Chemistry*, 86: 345-355.
- [19] Fidantsi, A. & Doxastakis, G. 2001. Emulsifying and foaming properties of Amaranth seed protein isolate. *Journal of Colloids and Surfaces*, 21: 119-124.
- [20] Lee, H., Yildiz, G., Santos, L.C., Andrade, J.E. & Feng, H. 2016. Soy protein with improved functional properties prepared by sequential pH treatment and ultrasonication. *Food Hydrocolloids*, 55: 200-209.
- LWT- *Food science and Technology*, 57: 376-382.
- [9] XU, L. & Diosady, L. L. 2002. Removal of phenolic compound in the production of high quality canola protein isolates. *Food Research International*, 35: 23-30.
- [10] Ghodsvali, A., Khodaparast, M. H. H., Vosoughi, M. & Diosady, L. L. 2005. Preparation of canola protein materials using membrane technology and evaluation of meals functional properties. *Food Research International*, 32: 223-231.
- [11] Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 2005. In Williams, S (Ed.), *Official method of analysis of AOAC International*. Arlington: AOAC International.
- [12] Febles, C. & Arias, I. 2001 . phytic acid level infant flour. *Food Chemistry*, 74: 437-441.
- [13] Wetter, C. R. & Youngs, C. G. 1976. A thiourea U.V assay for total glucosinolate content in rapeseed meals. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 53: 162-165.
- [14] Cumby, N., Zhong, Y., Naczk, M. & Shahidi, F. 2008. Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 109: 144-148.

Effects of extraction and precipitation conditions on efficiency and functional properties of rapeseed protein isolates

Mohammadzadeh, J. ^{1*}, Ghodsevali, A. R. ²

1. Assistant Professor, Agricultural Engineering Research Department ,Golestan Agricultural and Natural Resources Research Center, AREEO, Gorgan, Iran

2. Associate Professor, Assistant Professor, Agricultural Engineering Research Department ,Golestan Agricultural and Natural Resources Research Center, AREEO, Gorgan, Iran

(Received: 2015/09/13 Accepted: 2016/07/09)

High protein content and well-balanced essential amino acids in rapeseed meal have increased importance of this oil seed in recent years. The presence of complex protein compounds of rapeseed meal caused the extraction and precipitation of proteins depend on pH, which can also affect the efficiency and functional properties of protein. In this study, response surface and face central composite design were used to evaluate the effect of independent variables. i.e. alkaline protein extraction pH, (10-12) and acid protein precipitation pH (4.5-6.5) on the efficiency and functional properties of rapeseed (cv.Hyola) protein isolates. The determination coefficients of the fitted regression models were 0.98, 0.94, 0.91, 0.92, 0.90 and 0.93 for efficiency, water absorption, fat absorption, solubility index, emulsifying capacity and foaming capacity, respectively. The results showed that the effect of protein extraction and precipitation pH on efficiency, and water and fat absorptions was significant and the index of solubility, foaming and emulsifying properties were only affected by extraction pH. The optimum conditions for extraction and precipitation with maximum yield and functional properties of protein isolate at pH of 11.93 and 5.57 for extraction and precipitation, respectively. Under these conditions, yield, water absorption, fat absorption, solubility index, emulsifying capacity and foaming capacity were 89, 225, 185, 41, 64 and 165 percent, respectively.

Key Words: Protein isolate, Functional properties, RSM, Rapeseed / canola

*Corresponding Author E-Mail Address: jmohammadzadeh@yahoo.com