



بهینه‌سازی استخراج پروتئین دانه شبلیله به کمک امواج فراصوت و بررسی خصوصیات ساختاری،

عملکردی و فعالیت ضد اکسایشی آن

آلا قاسمی کیا<sup>۱</sup>، علی گنجلو<sup>۲\*</sup>، ماندانا بی مکر<sup>۲</sup>

۱-دانش آموخته کارشناسی ارشد فناوری مواد غذایی، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.

۲ دانشیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.

| اطلاعات مقاله   | چکیده   |
|---|---|
| <p>تاریخ های مقاله :</p> <p>تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۰۳</p> <p>تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۰۲</p>   | <p>پروتئین‌ها به دلیل ویژگی‌های عملکردی و سلامت بخشی یکی از اجزاء مهم فرآورده‌های غذایی محسوب می‌شوند. در میان پروتئین‌های گیاهی، پروتئین دانه شبلیله به دلیل میزان بالای اسید آمینه‌های ضروری بسیار مورد توجه قرار گرفته است. این پژوهش با هدف بهینه‌سازی استخراج پروتئین از دانه شبلیله به کمک امواج فراصوت و بررسی ویژگی‌های عملکردی، ساختاری و فعالیت ضد اکسایشی انجام شد. فراصوت با قدرت ۸۰ وات و مدت زمان ۲۸/۳۹ دقیقه شرایط بهینه برای استخراج پروتئین بود که تحت این شرایط بازده استخراج پیش بینی شده (۸/۶۵ درصد) مطابقت بسیار خوبی با مقدار تجربی (۸/۵۷ درصد) داشت. در طیف مادون قرمز تبدیل فوریه باندهای شاخص مربوط به آمید A، آمیدهای نوع I ، II و III مشاهده گردید. حلالیت پروتئین وابسته به تغییرات pH بود. ظرفیت جذب آب و روغن پروتئین استخراج شده به کمک امواج فراصوت به ترتیب معادل ۶/۲۴ و ۲/۷۲ میلی‌لیتر به ازاء یک گرم پروتئین به دست آمد. کمترین ظرفیت کف‌کنندگی (۴۴/۶۶ درصد) در pH معادل ۴/۵ و بیشترین ظرفیت کف‌کنندگی (۹۲/۴۹ درصد) در pH معادل ۱۰ مشاهده شد. بیشترین ظرفیت امولسیون‌کنندگی در pH ۱۰، به میزان ۸۴/۵۳ درصد و کمترین میزان در pH نقطه ایزوالکتریک (۵۴/۸۲ درصد) مشاهده شد. با ثابت در نظر گرفتن pH، پایداری کف و امولسیون در طول زمان کاهش یافت. نتایج نشان داد که می‌توان از فناوری فراصوت به‌طور کارآمدی جهت کاهش زمان فرایند استخراج پروتئین از دانه شبلیله استفاده نمود. به‌علاوه پروتئین دانه شبلیله استخراج شده به کمک امواج فراصوت دارای خواص عملکردی و ضد اکسایش مطلوبی است که استفاده از آن را در صنعت غذا امکان‌پذیر می‌سازد.</p> |
| <p>کلمات کلیدی:</p> <p>استخراج، روش شناسی سطح پاسخ، طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه، حلالیت پروتئین، ظرفیت کف‌کنندگی.</p> <p>DOI: 10.22034/FSCT.19.126.39</p> <p>DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.126.14.5</p> |   |
| <p>* مسئول مکاتبات:</p> <p>aganjloo@znu.ac.ir</p>   |   |

## ۱- مقدمه

استفاده از پروتئین‌ها به‌عنوان یک منبع تغذیه‌ای در راستای تأمین اسیدهای آمینه ضروری بدن خصوصاً در کشورهای در حال توسعه‌ی قابل اجتناب است [۱]. به‌علاوه، پروتئین‌ها به دلیل ویژگی‌های عملکردی، سلامت بخشی و حسی نقش مهمی به‌عنوان یکی از اجزاء فرمولاسیون غذایی بازی می‌کنند [۲]. متأسفانه عدم وجود توازن بین افزایش جمعیت انسان‌ها و تولید منابع پروتئینی خصوصاً انواع حیوانی سبب افزایش تکاپو جهت دستیابی به منابع جدید پروتئینی شده است. در سال‌های اخیر، استفاده از پروتئین‌های گیاهی به‌علت ارزش غذایی بالا و ویژگی‌های عملکردی مناسب همراه با قیمت کم و تنوع زیاد، بسیار مورد توجه قرار گرفته است. از مهم‌ترین ویژگی‌های عملکردی پروتئین‌ها می‌توان به ظرفیت نگهداری آب و روغن، حلالیت، تورم، تشکیل ژل، خصوصیات امولسیون‌کنندگی و کف‌زایی اشاره نمود که بر سیستم‌های غذایی طی آماده‌سازی، فرآوری، نگهداری و مصرف تأثیر بسزایی دارند [۳]. نحوه تولید آرد و یا ایزوله پروتئینی، منبع پروتئین، عوامل فیزیکی و شیمیایی نظیر دما، غلظت نمک، pH و نوع ترکیبات مرتبط با شبکه پروتئینی از جمله عوامل موثر بر خواص عملکردی پروتئین‌های گیاهی بشمار می‌روند [۴، ۵]. پیش از این استخراج پروتئین از منابع گیاهی مختلف نظیر نخود [۶]، ماش [۷]، خلر [۸]، عدس [۹]، کینوا [۱۰] انجام شده و خصوصیات ساختاری و عملکردی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفته است.

دانه شبلیله در میان بقولات به علت قیمت پایین، درصد پروتئین بالا و ارزش غذایی مطلوب بسیار مورد توجه قرار گرفته است [۱۱]. شبلیله بانام علمی *Trigonella foenum-graecum* گیاهی علفی، یک‌ساله، دولپه‌ای متعلق به خانواده فاباسه<sup>۱</sup> است که عمدتاً در کشورهای جنوب شرق آفریقا، جنوب غرب آسیا، هند و اطراف دریای مدیترانه کشت می‌شود [۱۲، ۱۳]. ریشه، دانه و اندام هوایی این گیاه غنی از متابولیت‌های ثانویه از جمله فنول‌ها و ساپونین‌ها است. دانه‌های گیاه حاوی ۳۶-۲۳ درصد پروتئین (آلبومین‌ها)، گلوبولین‌ها، گلوپتین‌ها و پرولامین‌ها، ۵۸ درصد کربوهیدرات و مقادیر زیادی آهن، فسفر و ویتامین D است [۱۴]. دانه شبلیله که معمولاً از آن به‌عنوان داروی گیاهی و ادویه استفاده می‌شود

دارای خواص دارویی نظیر اشتهاآور، ملین، خلط‌آور، عامل ضد دیابت، ضد تب، ضد اکسایش، ضد سرطان و کاهنده کلسترول خون می‌باشد [۱۵]. به‌علاوه مشخص شده است که دانه‌های شبلیله به دلیل محتوای پکتین بالا (۵۰ درصد) از طریق تشکیل سوسپانسیون کلوئیدی در زمان هیدراته شدن سبب کاهش سرعت تخلیه معده و جذب گلوکز می‌شوند [۱۶].

استخراج قلیایی و ترسیب پروتئین‌ها در نقطه ایزوالکتریک متداول‌ترین روش برای استخراج پروتئین از منابع مختلف گیاهی است. فرایند استخراج قلیایی پروتئین دانه شبلیله توسط فیضی و همکاران (۲۰۱۵) بهینه‌سازی گردید [۱۱]. شرایط بهینه استخراج شامل pH معادل ۹/۲۵ و غلظت سدیم کلرید ۰/۳۳ مولار بود. به‌علاوه، فیضی و همکاران (۲۰۱۵) طی مطالعه دیگری به بررسی خواص عملکردی ایزوله پروتئین شبلیله استخراج شده به روش استخراج قلیایی پرداختند [۱۷]. آنها گزارش کردند کمترین میزان حلالیت در pH برابر ۴/۵ رخ می‌دهد و ظرفیت کف‌کنندگی، امولسیون‌کنندگی، جذب آب و روغن به ترتیب حدوداً برابر ۱۳۶ درصد، ۳۹ درصد، ۲/۷ و ۶/۶ میلی‌لیتر به ازاء هر گرم ایزوله پروتئین می‌باشد. امروزه تمایل به استفاده از تکنیک‌های نوین استخراج نظیر استفاده از امواج مایکروویو [۱۸]، میدان الکتریکی پالسی [۱۹]، امواج فراصوت [۲۰-۲۲] و سیال فوق بحرانی [۲۳، ۲۴] افزایش یافته است. استخراج به کمک امواج فراصوت یکی از روش‌های نوین ارزان قیمت، ساده و کارآمد برای جداسازی ترکیبات موجود در گیاهان محسوب می‌شود. امواج فراصوت به امواج مکانیکی بافرکانس بیش از ۱۸ کیلوهرتز اطلاق می‌شود که برای انسان قابل تشخیص نمی‌باشند و غالباً برای انتشار نیاز به محیط مایع دارند [۲۵]. پدیده حفره‌زایی ناشی از امواج فراصوت با ایجاد تغییرات فیزیکی، شیمیایی و مکانیکی باعث تورم سلول‌های گیاهی و یا تجزیه دیواره سلولی در حین فرایند فراصوت شده و باعث شستن املاح از دیواره‌های سلولی تخریب شده می‌شود [۲۶]. حین عبور امواج فراصوت از محیط مایع‌ر اثر فروپاشی حباب‌های تشکیل شده دمایی در حدود ۵۰۰۰ درجه کلون و فشاری معادل ۵۰ مگاپاسکال به‌صورت موضعی تشکیل می‌شود. تغییرات فشار و دما ایجاد شده در اثر انفجار حباب‌ها سبب ایجاد نیروهای برشی، نازک شدن غشای سلولی و تخریب سلول‌ها و در نتیجه افزایش میزان نفوذ حلال به داخل سلول و افزایش انتقال جرم ترکیبات

1. Fabaceae

۴۱، آرد بدون چربی جهت حذف کامل حلال درون خشک‌کن با دمای ۴۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. آرد شنبلیله چربی‌زدایی شده و خشک تا زمان انجام آزمایشات درون کیسه نایلونی در مکان تاریک و دمای ۱۸- درجه سلسیوس قرار گرفت.

## ۲-۲-۲- استخراج پروتئین دانه شنبلیله به کمک امواج فراصوت

مقدار مشخصی از آرد شنبلیله چربی‌گیری شده (۵ گرم) با محلول نمکی سدیم کلرید ۰/۳۳ مولار با نسبت ۱ به ۲۰ وزنی-حجمی مخلوط شد. سپس pH مخلوط به منظور انحلال پروتئین با استفاده از سدیم هیدروکسید ۱ مولار معادل ۹/۲۵ تنظیم گردید [۱۱]. برای استخراج پروتئین از دستگاه فراصوت پروب (UP200H, Hielscher, Germany) با توان ۲۰۰ وات، فرکانس ۲۴ کیلوهرتز، مجهز به سونوتروود از جنس تیتانیوم با قطر ۳ میلی‌متر استفاده شد. قدرت امواج فراصوت و مدت زمان اعمال امواج فراصوت فراسنجه‌های مستقل مورد مطالعه در این پژوهش بودند (جدول ۱). تغییرات pH در طول زمان اعمال فراصوت کنترل شد. پس از اتمام زمان استخراج به کمک فراصوت، مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و با سرعت ۴۵۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس با استفاده از کلریدریک اسید ۱ مولار pH در نقطه ایزوالکتریک معادل ۴/۵ به منظور ترسیب پروتئین تنظیم شد و دوباره در سرعت ۴۵۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه جهت جداسازی فاز رسوبی حاوی پروتئین سانتریفیوژ شد. در گام بعد رسوب پروتئین با آب مقطر با نسبت ۱ به ۵ وزنی-حجمی طی دو مرحله به منظور افزایش خلوص شستشو داده شد و یک‌بار دیگر در سرعت ۴۵۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس پروتئین به دست آمده در آب دیونیزه حل شد و با استفاده از سدیم هیدروکسید ۱ مولار تا رسیدن به pH معادل ۷/۲ خنثی گردید. در نهایت پروتئین به دست آمده با استفاده از خشک‌کن انجمادی، خشک شد و تا زمان آزمایشات بعدی در مکان تاریک و دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد. برای تعیین درصد پروتئین در نمونه از روابط زیر استفاده شد.

$$Y_N = \frac{V \times N_{acid} \times 1.401}{M}$$

$$Y_P = Y_N \times C_p$$

هدف به داخل حلال می‌گردد [۲۷]. چنین پدیده‌ای سبب افزایش کارایی استخراج از طریق افزایش انتقال جرم و سازوکارهای نفوذ داخلی<sup>۲</sup> می‌گردد [۲۸]. از این فناوری به‌طور موفقیت آمیزی برای افزایش میزان استخراج پروتئین از ماهی ماکرل [۲۰]، سویا [۲۹]، کلزا [۳۰] و لوبیای سیاه [۳۱] استفاده شده است. تاثیرات فراصوت بر اصلاح پروتئین به لحاظ ساختاری، عملکردی و شیمیایی به اثبات رسیده است [۳۱-۳۳]. بررسی منابع نشان می‌دهد تاکنون مطالعه‌ای بر روی تاثیر فراصوت بر راندمان استخراج پروتئین از دانه شنبلیله و خواص عملکردی و ضد اکسایشی آن انجام نشده است. لذا این پژوهش با هدف بهینه‌سازی استخراج پروتئین از دانه شنبلیله با کمک امواج فراصوت و بررسی خصوصیات ساختاری، عملکردی و ضد اکسایشی پروتئین شنبلیله به‌عنوان جایگزین منابع پروتئین حیوانی در سیستم‌های غذایی مختلف نظیر امولسیون، ژل و کف انجام شده است.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- مواد

دانه‌های شنبلیله مورد استفاده در این پژوهش از بازار محلی زنجان تهیه شدند. کلیه حلال‌ها و مواد شیمیایی با درجه آزمایشگاهی از شرکت‌های مرک، سیگما و مجلی تهیه شدند. از روغن مایع آفتابگردان (طبیعت، ایران) برای تهیه امولسیون استفاده شد.

### ۲-۲- روش‌ها

#### ۲-۲-۱- آماده‌سازی آرد چربی‌گیری شده از دانه شنبلیله

ابتدا دانه‌های شنبلیله تمیز و عاری از مواد زائد با استفاده از یک آسیاب آزمایشگاهی خرد و سپس به‌منظور تولید پودر یکنواخت از یک الک با مش ۴۰ عبور داده شدند. آرد به دست آمده به‌منظور چربی‌زدایی با نسبت ۱ به ۵ وزنی-حجمی با هگزان نرمال مخلوط شد و پس از شش ساعت هم‌زدن توسط یک هم‌زن مغناطیسی در دمای محیط، آرد بدون چربی شنبلیله آماده شد. به‌منظور افزایش کارایی فرایند چربی‌زدایی هر سه ساعت یک‌بار حلال هگزان نرمال تعویض گردید [۳۴]. پس از جدا کردن حلال هگزان نرمال توسط کاغذ صافی واتمن شماره

2. Internal diffusion mechanisms

میزان حلالیت پروتئین در pHهای معادل ۲، ۴/۵، ۶، ۸ و ۱۰ انجام شد [۳۷].

## ۲-۶- ظرفیت جذب آب<sup>۴</sup> و جذب روغن<sup>۵</sup>

اندازه‌گیری ظرفیت جذب آب و روغن بر اساس روش بوچات (۱۹۷۷) انجام شد [۳۸]. بدین منظور ۲/۵ میلی‌لیتر روغن آفتابگردان یا آب دیونیزه ( $V_0$ ) به ۲۵۰ میلی‌گرم پروتئین شنبلیله ( $W$ ) اضافه و به مدت دو دقیقه توسط دستگاه ورتکس مخلوط شد. پس از ۳۰ دقیقه نگهداری در دمای محیط، با سرعت ۳۰۰۰ دور بر دقیقه مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ و فاز رویی شامل آب یا روغن ( $V_1$ ) جدا و دور ریخته شد. به‌منظور حصول اطمینان از تخلیه کامل آب و روغن، لوله‌ها به مدت چند دقیقه روی کاغذ صافی به صورت واژگون نگه داشته شدند. ظرفیت جذب آب و روغن از طریق رابطه زیر محاسبه گردید:

$$\text{WHC or OHC (ml/gr)} = V_0 - V_1 / W$$

## ۲-۷- تعیین ظرفیت کف‌کنندگی<sup>۶</sup> و پایداری کف<sup>۷</sup>

محلول ۲ درصد پروتئین شنبلیله با استفاده از آب مقطر تهیه شد و pH محلول پروتئینی در مقادیر ۲، ۴/۵، ۶، ۸ و ۱۰ با استفاده از کلریدریک اسید و یا سدیم هیدروکسید ۰/۵ مولار تنظیم شد. محلول‌های پروتئینی به مدت ۵ دقیقه با استفاده از یک هم‌زن مغناطیسی به آرامی هم‌زدو در نهایت به فالتکون مدرج منتقل شدند. حجم محلول قبل از هم‌زدن ( $V_0$ ) و بلافاصله پس از هم‌خوردن ( $V_1$ ) به مدت ۲ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه توسط دستگاه هم‌زن‌ایزر دور بالا (SR-30, MTOPS, Korea) ثبت شد [۳۹]. میزان ظرفیت کف‌کنندگی از طریق رابطه زیر محاسبه گردید:

$$\text{FC\%} = (V_1 - V_0) / V_0 \times 100$$

حجم کف ( $V_2$ ) طی دوره زمانی ۳۰-۱۲۰ دقیقه پس از مخلوط کردن به‌منظور بررسی پایداری کف ثبت و از طریق رابطه زیر محاسبه شد:

$$\text{FS\%} = (V_2 - V_0) / (V_1 - V_0) \times 100$$

در این روابط،  $Y_N$  درصد ازت،  $V$  حجم اسید مصرفی،  $N_{acid}$  نرمالیت اسید،  $M$  وزن نمونه،  $Y_p$  درصد پروتئین و  $C_p$  ضریب پروتئین است و نرمالیت اسید مصرفی و ضریب پروتئین به ترتیب معادل ۰/۱ مول بر لیتر و ۶/۲۵ می‌باشد.

## ۲-۳- طیف‌سنجی ماوراء بنفش

برای انجام این آزمون، محلول آبی پروتئین با غلظت دو میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه و میزان جذب در طول موج‌های ۲۰۰-۴۰۰ نانومتر توسط دستگاه طیف سنج ماوراء بنفش - مرئی (Analytikjena, SPECORD 250, Germany) خوانده شد.

## ۲-۴- طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FT-IR)

جهت بررسی و تشخیص پیوند در پروتئین استخراج شده از دانه شنبلیله از آزمون طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه منطبق با روش چن و همکاران (۲۰۱۱) استفاده شد [۳۵]. بدین منظور ابتدا پروتئین شنبلیله با پتاسیم برومید به نسبت ۱:۱۰ مخلوط شد. مخلوط حاصل به‌صورت قرص نازک درآورده شد و میزان جذب در محدوده‌ی ۴۰۰ تا ۴۰۰۰ بر سانتی‌متر توسط دستگاه طیف‌سنج مادون قرمز (Nicolet IS10, Thermo scientific, USA) اندازه‌گیری شد.

## ۲-۵- حلالیت پروتئین<sup>۳</sup>

در ابتدا محلول پروتئینی با غلظت ۱/۵ درصد با کمک آب دیونیزه تهیه گردید و pH آن توسط کلریدریک اسید و یا سدیم هیدروکسید ۰/۵ مولار تنظیم گردید. سپس محلول پروتئینی به مدت ۳۰ دقیقه به کمک یک هم‌زن مغناطیسی در دمای اتاق هم‌زده شد و به‌منظور جداسازی پروتئین غیرمحلول در سرعت ۵۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید [۳۶]. میزان پروتئین در فاز رویی با اضافه کردن معرف بیورتو نگهداری به مدت ۲۰ دقیقه به کمک دستگاه طیف‌سنج ماوراء بنفش-مرئی (Analytikjena, SPECORD 250, Germany) در طول موج ۵۴۰ نانومتر تعیین گردید. برای رسم منحنی کالیبراسیون از محلول سرم آلبومین گاو در غلظت‌های صفر تا ۱۰ (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در معرف بیورت استفاده گردید و معادله به‌دست آمده به‌صورت  $y=0.0345x+0.3407$  بود. لازم به ذکر است که بررسی

4. Water holding capacity (WHC)  
5. Oil holding capacity (OHC)  
6. Foaming capacity (FC)  
7. Foam stability (FS)

3. Protein solubility

## ۸-۲- ظرفیت امولسیون‌کنندگی<sup>۸</sup> و پایداری حرارتی امولسیون<sup>۹</sup>

بررسی ظرفیت امولسیون‌کنندگی و پایداری حرارتی امولسیون به روش توتو و همکاران (۲۰۰۱) با اندکی اصلاحات انجام شد [۴۰]. ابتدا محلول ۱ درصد پروتئین شنبلیله با استفاده از آب مقطر تهیه شد. سپس pH محلول پروتئینی در مقادیر ۲، ۴/۵، ۶، ۸ و ۱۰ با استفاده از کلریدریک اسید و یا سدیم هیدروکسید ۰/۵ مولار تنظیم شد. سپس روغن آفتابگردان به محلول پروتئینی اضافه و به مدت ۲/۵ دقیقه توسط یک همزن مغناطیسی به آرامی و پس از آن به مدت ۲/۵ دقیقه توسط دستگاه همزنایزر دور بالا دقیقه هم‌زده شد. در انتها امولسیون به دست آمده در سرعت ۱۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ شد. ارتفاع لایه امولسیون قبل ( $H_0$ ) و بعد از سانتریفیوژ اندازه‌گیری شد ( $H_1$ ). ظرفیت امولسیون‌کنندگی با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید:

$$EC\% = H_1 / H_0 \times 100$$

جهت پایداری حرارتی امولسیون، نمونه‌ها دقیقاً قبل از سانتریفیوژ در بنماری با دمای ۸۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند و پایداری امولسیون طی دوره زمانی ۳۰-۱۲۰ دقیقه در هر pH پس از پایان حرارت‌دهی اندازه‌گیری شد ( $H_2$ ).

$$ETS\% = H_2 / H_1 \times 100$$

## ۹-۲- اندازه‌گیری فعالیت ضد اکسایشی به روش ۱،۱-دیفنیل-۲-پیکریل-هیدرازیل (DPPH)

فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH توسط پروتئین دانه شنبلیله طبق روش ژئی و همکاران (۲۰۱۲) اندازه‌گیری شد [۴۱]. ابتدا یک میلی‌لیتر از محلول نمونه با غلظت‌های مختلف (۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با یک میلی‌لیتر محلول اتانولی ۰/۱ میلی‌مولار DPPH مخلوط و ۳۰ دقیقه در دمای محیط و مکان تاریک قرار داده شد. سپس جذب نمونه در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد. میزان فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH با استفاده از رابطه زیر

محاسبه شد. از آسکوربیک اسید در غلظت‌های مشابه به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

$$DPPH\text{ freradicalscavenegingactivity}\% = 1 - (Ab_2 - Ab_1) / Ab_0 \times 100$$

در این رابطه  $Ab_0$  میزان جذب محلول DPPH بدون اضافه کردن نمونه،  $Ab_1$  میزان جذب نمونه بدون اضافه کردن محلول DPPH و  $Ab_2$  میزان جذب محلول DPPH و نمونه می‌باشد.

## ۱۰-۲- بهینه‌سازی فرایند استخراج و تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

در این پژوهش، از نرم افزار آماری Design Expert 7.0.3 (Minneapolis, USA) برای اعمال روش شناسی سطح-پاسخ، بررسی روابط میان فراسنجه‌های مستقل و پاسخ، ایجاد نمودارهای سه بعدی و بهینه‌یابی استفاده شد. آزمایشات بر اساس طرح باکس-بنکن شامل ۱۳ تیمار با ۵ تکرار در نقطه مرکزی بود. فراسنجه‌های مورد مطالعه و سطوح بالا (+۱)، میانی (صفر) و پایینی (-۱) آنها بر اساس مطالعات اولیه انتخاب گردید (جدول ۱). از مدل چند جمله‌ای برای مدل‌سازی فرایند استفاده شد. مدل درجه دوم را می‌توان به‌صورت زیر نوشت:

$$Y(\%) = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j$$

در این رابطه  $\beta_0$ ،  $\beta_i$ ،  $\beta_{ii}$  و  $\beta_{ij}$  ضرایب رگرسیونی به ترتیب برای عرض از مبدأ، اثرات خطی، درجه دوم، اثرات متقابل و  $X_i$  و  $X_j$  فراسنجه‌های مستقل هستند. از آزمون ضعف برازش<sup>۱۰</sup>، ضریب تغییرات (C.V.)، ضریب تبیین ( $R^2$ )، ضریب تبیین اصلاح شده ( $adj-R^2$ ) و عدد  $p$  در سطح اطمینان ۹۵ درصد برای بررسی صحت مدل و تاثیر فراسنجه‌ها استفاده شد. برای تعیین شرایط بهینه از روش بهینه‌سازی عددی<sup>۱۱</sup> با هدف به حداکثر رساندن راندمان استخراج پروتئین از دانه شنبلیله استفاده شد. برای اعتبارسنجی مدل پیشنهادی، مقادیر راندمان استخراج پیش‌بینی شده با مقادیر تجربی به دست آمده تحت شرایط بهینه (حداقل ۵ تکرار) مقایسه گردید. تجزیه و تحلیل آماری داده‌های آزمایشگاهی از طریق مقایسه میانگین بر اساس آزمون توکی در سطح اطمینان ۹۵ درصد و با

10. Lack-of-fit test  
11. Numerical optimization

8. Emulsion stability (ES)  
9. Emulsion thermal stability (ETS)

وضوح توسط ضریب تبیین ( $R^2=0/9807$ ) و ضریب تبیین تعدیل شده ( $adj-R^2=0/9669$ ) نشان داده شده است. تکرارپذیری و قابلیت اطمینان به مدل توسط مقدار کم ضریب واریانس (۳/۹۱) نیز تایید شد. شکل ۱ نیز مؤید انطباق مطلوب بین داده‌های تجربی و پیش بینی شده است. شکل ۲ نمودار پرشیدگی دو فراسنجه مستقل مورد مطالعه شامل قدرت امواج فراصوت و زمان اعمال فراصوت در فرایند استخراج پروتئین از دانه شنبلیله به کمک امواج فراصوت را نشان می‌دهد. از آنجایی که وجود انحناء در نمودار نشانگر حساسیت پاسخ به فراسنجه مورد مطالعه است لذا حساسیت عملکرد استخراج پروتئین از دانه شنبلیله به صورت سطح پاسخ سه بعدی در شکل ۳ نشان داده شده است. همان‌طور که ملاحظه می‌شود عملکرد استخراج پروتئین از دانه شنبلیله به ترتیب با افزایش زمان اعمال فراصوت و میزان قدرت امواج فراصوت به ترتیب تا ۲۵ دقیقه و ۸۰ وات افزایش یافت. با افزایش قدرت امواج فراصوت مقدار حفره‌سازی افزایش می‌یابد که این امر می‌تواند با ایجاد شوک‌های مکانیکی شدید منجر به شکستن مؤثرتر غشاء سلول‌های گیاهی گردد. در نهایت این رخداد می‌تواند منجر به افزایش سرعت انتقال جرم به‌علت سرعت بالای انتشار حلال به داخل سلول‌ها و در نتیجه انتشار بیشتر مواد حل شونده به محیط اطراف شود [۴۲].

استفاده از نرم افزار Minitab نسخه ۱۶ انجام شد. تمامی آزمون‌ها با سه تکرار انجام شدند و نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار گزارش گردید.

### ۳- نتایج و بحث

#### ۳-۱- بررسی تاثیر فراسنجه‌های مستقل بر عملکرد استخراج پروتئین از دانه شنبلیله و بهینه‌سازی فرایند

مقادیر تجربی حاصل از انجام ۱۳ تیمار شامل ۵ تکرار در نقطه مرکزی در جدول ۱ نشان داده شده است محدوده عملکرد استخراج پروتئین شنبلیله در محدوده ۴/۴ تا ۸/۴ درصد قرار داشت. براساس جدول ۲، آزمون F برای مدل درجه دوم معنی‌دار بود ( $F\text{-value}=71/01$ ,  $p<0/0001$ ). به علاوه، اثرات خطی، درجه دوم و متقابل تمامی فراسنجه‌های مستقل مورد مطالعه تاثیر معنی‌داری بر پاسخ داشتند (جدول ۲). مدل چندجمله‌ای نهایی حاصل به شرح زیر بود:

$$Y=8/03+1/28A+0/75B+0/33AB-1/77A^2-0/47B^2$$

در این معادله،  $Y$  راندمان استخراج پروتئین از دانه شنبلیله (درصد)،  $A$  قدرت امواج فراصوت (وات) و  $B$  زمان اعمال فراصوت (دقیقه) بود. علائم مثبت و منفی ضرایب ترتیب نشان دهنده اثرات سینرژیستی و آنتاگونیستی فراسنجه‌های مستقل بر پاسخ می‌باشند. دقت و ارتباط بین پاسخ و متغیرهای مستقل به

**Table 1** Box-Behnken experimental design for determination of ultrasound-assisted Fenugreek seed protein extraction yield

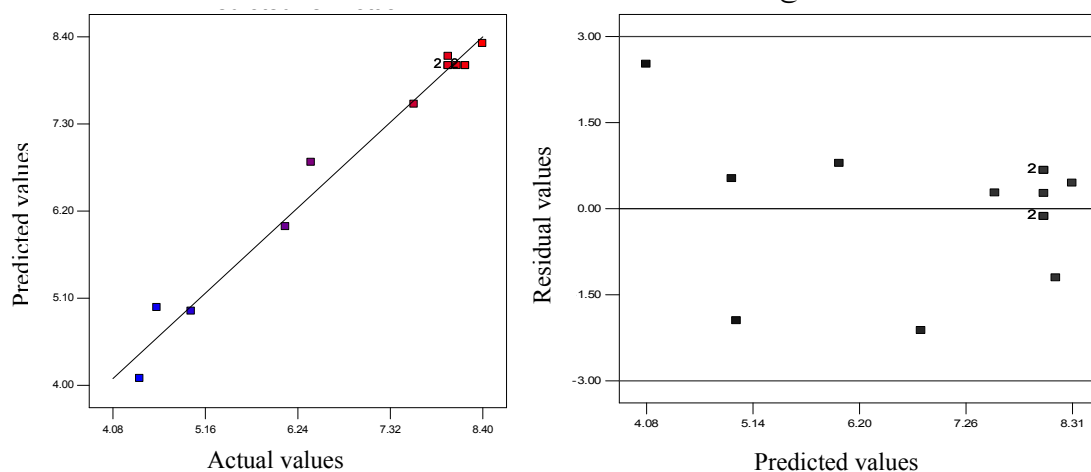
| Independent variables | Levels              |                       |                        |                     |
|-----------------------|---------------------|-----------------------|------------------------|---------------------|
|                       | -1                  | 0                     | +1                     |                     |
| Ultrasonic power(W)   | 40                  | 70                    | 100                    |                     |
| Sonication time (Min) | 10                  | 20                    | 30                     |                     |
| No                    | Ultrasonic power(W) | Sonication time (Min) | Experimental yield (%) | Predicted yield (%) |
| 1                     | 40                  | 10                    | 4.4                    | 4.08                |
| 2                     | 100                 | 10                    | 6.1                    | 6.00                |
| 3                     | 40                  | 30                    | 5.0                    | 4.93                |
| 4                     | 100                 | 30                    | 8.0                    | 8.15                |
| 5                     | 40                  | 20                    | 4.6                    | 4.98                |
| 6                     | 100                 | 20                    | 7.6                    | 7.55                |
| 7                     | 70                  | 10                    | 6.4                    | 6.81                |
| 8                     | 70                  | 30                    | 8.4                    | 8.31                |
| 9                     | 70                  | 20                    | 8.2                    | 8.03                |
| 10                    | 70                  | 20                    | 8.0                    | 8.03                |
| 11                    | 70                  | 20                    | 8.0                    | 8.03                |
| 12                    | 70                  | 20                    | 8.1                    | 8.03                |
| 13                    | 70                  | 20                    | 8.2                    | 8.03                |

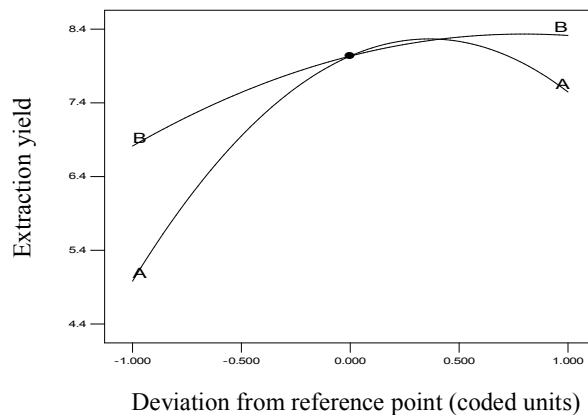
**Table 2** Analysis of variance (ANOVA) for effect of independent variables on ultrasound-assisted extraction yield of Fenugreek seedprotein

| Source              | Sum of square | df | Mean square | F-value | <i>p</i> -value prob> F |             |
|---------------------|---------------|----|-------------|---------|-------------------------|-------------|
| Model               | 26.58         | 5  | 5.32        | 71.01   | <0.0001                 | Significant |
| A- Ultrasonic power | 9.88          | 1  | 9.88        | 132.02  | <0.0001                 |             |
| B- Sonication time  | 3.37          | 1  | 3.37        | 45.09   | 0.0003                  |             |
| AB                  | 0.42          | 1  | 0.42        | 5.64    | 0.0492                  |             |
| A <sup>2</sup>      | 8.66          | 1  | 8.66        | 115.69  | <0.0001                 |             |
| B <sup>2</sup>      | 0.61          | 1  | 0.61        | 8.18    | 0.0244                  |             |
| Residual            | 0.52          | 7  | 0.07        |         |                         |             |
| Lack-of-Fit         | 0.48          | 3  | 0.16        | 16.13   | 0.0106                  | Significant |
| Pure error          | 0.04          | 4  | 1.00E-002   |         |                         |             |
| Cor total           | 27.10         | 12 |             |         |                         |             |

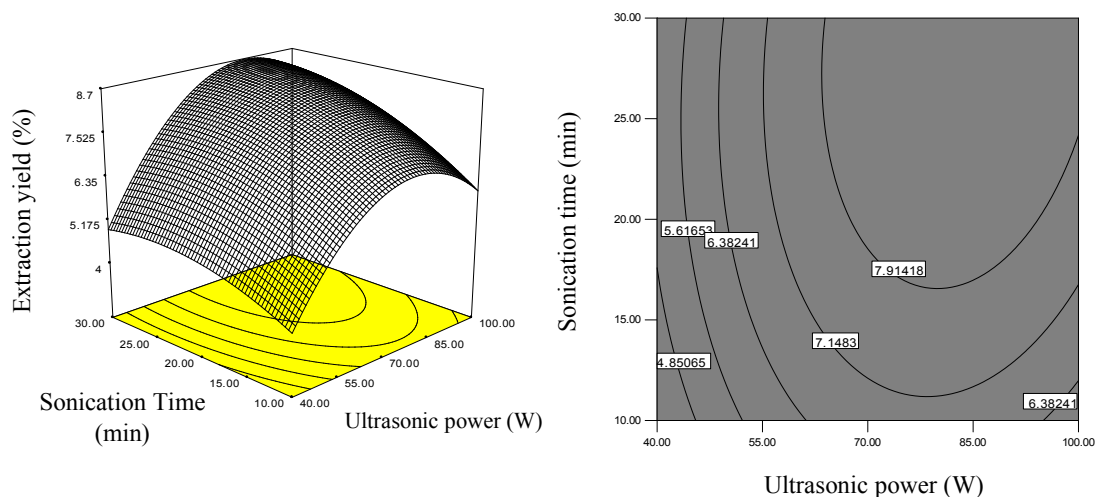
وات و زمان اعمال فراصوت معادل ۲۸/۳۹ دقیقه استفاده نمود. تحت این شرایط میزان عملکرد کمی استخراج معادل ۸/۶۵ درصد بود. عدم وجود تفاوت چشمگیر بین مقادیر به دست آمده از مدل و مشاهدات تجربی به خوبی کارایی مدل را اثبات می‌نماید (جدول ۳). فیضی و همکاران (۲۰۱۵) طی مطالعه‌ای به بهینه‌سازی فرایند استخراج قلیایی پروتئین از دانه شبلیله پرداختند و نتایج نشان داد که تحت شرایط بهینه شامل pH معادل ۹/۲۵ و محلول نمکی سدیم کلرید ۰/۳۳ مولار در مدت زمان ۲ ساعت می‌توان به حدود ۱۹ درصد عملکرد کمی استخراج پروتئین دست یافت. آنها محتوای پروتئینی ایزوله به دست آمده را ۸۶/۹ درصد گزارش کردند در حالی که محتوای پروتئینی ایزوله پروتئینی استخراج شده به کمک امواج فراصوت در مطالعه حاضر ۸۷/۱ درصد بود. نتایج به دست آمده کارایی فناوری فراصوت را کاهش زمان فرایند استخراج پروتئین از دانه شبلیله را به اثبات می‌رساند [۱۱].

افزایش قدرت امواج فراصوت به بیش از ۸۰ وات موجب کاهش عملکرد استخراج پروتئین از دانه شبلیله می‌شود. کاهش عملکرد استخراج در توان‌های بالاتر فراصوت به دلیل تخریب پروتئین می‌باشد. نتایج از دانه شبلیله بیشتر تحت تاثیر قدرت امواج فراصوت (A) قرار دارد. همان‌طور که بیشتر اشاره شد زمان اعمال فراصوت تا یک حد آستانه بر عملکرد استخراج پروتئین نقش مثبت دارد. همان‌طور که ملاحظه می‌شود افزایش زمان اعمال فراصوت به بیش از ۲۵ دقیقه تاثیر چشمگیری بر افزایش عملکرد استخراج پروتئین از دانه شبلیله نداشت به این معنی که فرایند استخراج به حالت تعادل می‌رسد [۴۳]. نتایج مطالعات متعدد نیز حاکی از آن است که استفاده از زمان‌های طولانی اعمال فراصوت تاثیر چشمگیری بر افزایش راندمان استخراج ندارد [۴۳-۴۵]. با توجه به نتایج بهینه‌سازی با استفاده از تکنیک عددی، برای به حداکثر رساندن عملکرد استخراج پروتئین از دانه شبلیله به کمک فراصوت می‌توان از قدرت امواج فراصوت معادل ۸۰

**Fig 1** Relationship between actual vs. predicted values by proposed model



**Fig 2** Perturbation plot of (A) ultrasonic power and (b) sonication time on extraction yield of Fenugreek seed protein



**Fig 3** 3D plot of the effect of ultrasonic power and sonication time on extraction yield of Fenugreek seed protein.

**Table 3** Optimized conditions for ultrasound-assisted extraction of Fenugreek seed protein

| Ultrasonic power (W) | Sonication time (min) | Predicted extraction yield (%) | Experimental extraction yield (%) | Desirability |
|----------------------|-----------------------|--------------------------------|-----------------------------------|--------------|
| 80                   | 28.39                 | 8.65                           | 8.57±0.10                         | 1.00         |

طیف سنجی مادون قرمز روشی کارآمد برای بررسی گروه‌های عاملی می‌باشد [۴۶]. وجود باند در محدوده  $3500-3200 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به آمید A است که نشان‌دهنده ارتعاشات کششی  $\text{NH}$ - در ساختار پروتئین است. باند جذبی در  $2925 \text{ cm}^{-1}$  بیانگر حالت کششی متقارن گروه متیلن ( $\text{CH}_2$ ) است که معمولاً در زنجیره خطی جانبی پروتئین‌ها دیده می‌شود [۴۷]. وجود سه باند در  $1654$ ،  $1545$  و  $1401$  به ترتیب مربوط به آمید I، آمید II و آمید III است

### ۲-۳- طیف‌سنجی ماوراء بنفش

وجود پیک در  $260$  و  $280$  نانومتر بیانگر وجود اسید نوکلئیک یا پروتئین در نمونه است. در طیف به دست آمده از محلول مورد مطالعه یک پیک در حدود  $280$  نانومتر قابل مشاهده است که تایید کننده وجود پروتئین می‌باشد (شکل ۴- الف).

### ۳-۳- طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوری



الکترواستاتیکی بین اسیدهای آمینه با بارهای هم‌نام افزایش و در نتیجه حلالیت بیشتر می‌شود [۴۹]. تغییرات حلالیت پروتئین شنبلیله در pHهای ۲، ۴/۵، ۶، ۸ و ۱۰ در جدول ۴ نمایش داده شده است. تغییرات pH تاثیر معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) بر حلالیت پروتئین شنبلیله داشت. کمترین و بیشترین میزان حلالیت پروتئین به ترتیب در pH معادل ۴/۵ و ۱۰ به دست آمد. نتایج به دست آمده در تحقیقات فیضی و همکاران (۲۰۱۵) و همچینال نسری و ال تینای (۲۰۰۷) نیز مؤید چنین نتیجه‌ای بود [۳، ۱۱]. دلیل کاهش حلالیت در pH معادل ۴/۵ را می‌توان به تعادل بارهای ناهم‌نام در نقطه pH ایزوالکتریک و در نتیجه کاهش نیروهای دافعه الکترواستاتیک نسبت داد که منجر به آگلومره شدن و رسوب پروتئین از طریق ایجاد پیوندهای آب‌گریز می‌گردد [۱۱]. همان‌طور که پیشتر نیز ذکر شد با فاصله گرفتن از نقطه pH ایزوالکتریک حلالیت افزایش می‌یابد. به‌طور کلی پروتئین استخراج شده به کمک فراصوت در مقایسه با روش استخراج قلبایی از حلالیت بالاتری برخوردار بود. در مطالعه دلیل حلالیت بیشتر پروتئین استخراج شده به کمک فراصوت را می‌توان به تغییر کنفورماسیونی به‌علت بازشدن ساختار پروتئین در حین تیمار فراصوت به دلیل وقوع پدیده حفره‌زایی نسبت داد که سبب می‌شود باندهای پپتیدی شکسته شده و اسیدهای آمینه قطبی به راحتی در دسترس آب قرار گرفته و سبب افزایش حلالیت پروتئین گردد [۵۳]. نتایج به دست آمده با نتایج جمبراک و همکاران (۲۰۰۹)، جین و آنال (۲۰۱۶) و مالیک و همکاران (۲۰۱۷) مطابقت داشت [۵۰-۵۲].

### ۳-۵- ظرفیت جذب آب و روغن

مهم‌ترین خصوصیت فیزیکی پروتئین‌ها جذب آب است که بر بافت و گرانیوی ماده غذایی حاوی پروتئین اثر می‌گذارد و به‌علاوه از نظر فساد ماده غذایی نیز، به دلیل تأثیری که بر میزان فعالیت آب دارد بسیار حائز اهمیت است [۵۰]. نتایج ظرفیت جذب آب و روغن پروتئین استخراج شده از دانه شنبلیله به کمک امواج فراصوت در جدول ۴ آورده شده است. ظرفیت جذب آب پروتئین شنبلیله حدوداً ۶/۲۴ میلی‌لیتر به ازاء هر گرم بود. فیضی و همکاران (۲۰۱۵) میزان جذب آب پروتئینی استخراج شده از دانه شنبلیله به روش استخراج قلبایی را تحت شرایط بهینه معادل ۲/۷ میلی‌لیتر به ازاء هر گرم گزارش کردند [۱۱]. نتایج جین و آنال (۲۰۱۶) نیز نشان داد اعمال فراصوت

[۴۸]. باند مربوط به ناحیه آمید I ناشی از ارتعاشات کششی C=O، آمید II عمدتاً ناشی از ارتعاشات کششی C-N یا خمشی N-H گروه‌های عاملی پروتئین است در حالی که آمید III توسط ارتعاشات کششی C-N حاصل می‌گردد. وجود پیک در  $1242 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به حالت کششی C-N است در حالی که باند در محدوده  $1068 \text{ cm}^{-1}$  با ارتعاشات کششی نامتقارن C-O-C است (شکل ۴-ب)

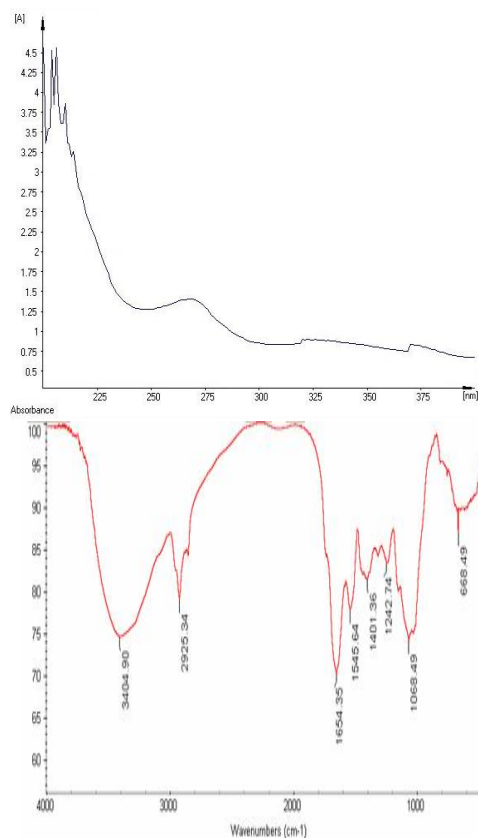


Fig 4 (a) UV spectrum between 200-400 nm (b) FTIR spectrum between 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  of Fenugreek seed protein

### ۳-۴- حلالیت پروتئین

حلالیت یکی از مهم‌ترین خواص عملکردی پروتئین‌ها است که کارایی ترکیبات پروتئینی را در فرمولاسیون‌های غذایی کنترل می‌کند. این ویژگی با توجه به تاثیر بر سایر ویژگی‌های عملکردی پروتئین در شرایط مختلف از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. معمولاً میزان حلالیت پروتئین‌ها وابسته به تغییرات pH است و در pHهای بالاتر و پایین‌تر از نقطه ایزوالکتریک به ترتیب به دلیل افزایش بار منفی ناشی از گروه‌های کربوکسیل و بار مثبت گروه‌های آمینی، نیروی دافعه

احساس دهانی و ویژگی عطر و طعم دارد [۵۰]. میزان جذب روغن پروتئین شنبلیله استخراج شده به کمک امواج فراصوت ۲/۷۲ میلی لیتر به ازاء هر گرم بود. در حالی که ال نسری و ال تیناری (۲۰۰۷) و فیضی و همکاران (۲۰۱۵) ظرفیت جذب روغن ایزوله پروتئینی شنبلیله را به ترتیب معادل ۱/۵۶ و ۶/۶ میلی لیتر به ازاء هر گرم ایزوله گزارش کرده اند [۱۱، ۳]. جین و آنال (۲۰۱۶) گزارش کردند که اعمال فراصوت تأثیری بر بهبود قابلیت جذب روغن هیدرولیزات‌ها پروتئینی استخراج شده از غشاء پوسته تخم مرغ ندارد [۵۰]. دلیل تفاوت در ظرفیت جذب روغن در پروتئین استخراج شده به کمک فراصوت و استخراج شده به روش قلیایی را می توان به نوع برهمکنش زنجیره های غیرقطبی پروتئین با زنجیره های جانبی هیدروکربنی روغن و شکل فضایی پروتئین [۵۸] و همچنین تعداد اسیدهای آمینه غیرقطبی در زنجیره جانبی پروتئین‌ها [۵۹] نسبت داد.

سبب افزایش ظرفیت جذب آب هیدرولیزات‌های پروتئینی حاصل از غشاء پوسته تخم مرغ شده است [۵۰]. به طور کلی دلیل افزایش ظرفیت جذب آب را می توان به تغییرات ریزساختار، کنفورماسیون پروتئین‌ها در اثر اعمال فراصوت [۵۴]، دناتور شدن پروتئین‌ها [۵۵] و همچنین حضور کربوهیدرات‌های آب دوست و مقدار چربی نسبت داد [۵۶]. منظور از جذب روغن، محبوس شدن فیزیکی روغن در شبکه پروتئینی است که به شکل فضایی پروتئین وزنجیره های غیرقطبی پروتئین و نوع برهمکنش (پیوندهای غیرکووالانسی مانند پیوندهای آب گریز، الکترواستاتیک و هیدروژنی) با زنجیره های جانبی هیدروکربنی روغن بستگی دارد [۵۷]. قابلیت جذب روغن توسط پروتئین‌ها تأثیر بسزایی بر افزایش زمان ماندگاری مواد غذایی فرآوری شده از طریق کاهش میزان رطوبت و چربی و بهبود ویژگی های حسی خصوصا ویژگی

**Table 4** Functional properties of ultrasound-assisted extracted Fenugreek seed protein

| Functional properties       |                               |                             |
|-----------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| Protein solubility* (mg/mL) | Water holding capacity (mL/g) | Oil holding capacity (mL/g) |
| 8.92±0.48 <sup>ab</sup>     |                               |                             |
| 4.26±0.31 <sup>d</sup>      |                               |                             |
| 7.89±0.51 <sup>c</sup>      | 6.24±0.18                     | 2.72±0.10                   |
| 8.14±0.24 <sup>bc</sup>     |                               |                             |
| 9.41±0.19 <sup>a</sup>      |                               |                             |

\*Values represent protein solubility at pH of 2, 4.5, 6, 8 and 10, respectively. The values with different superscript letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).

نتایج به دست آمده از تحقیقات فیضی و همکاران (۲۰۱۵) بر روی ایزوله پروتئین شنبلیله و همچنین ال نسری و ال تیناری (۲۰۰۷) نیز مؤید نتایج به دست آمده در این پژوهش می باشد [۱۷، ۳]. pH های قلیایی و اسیدی قابلیت کف‌کنندگی بیشتری نسبت به pH در نقطه ایزوالکتریک داشتند که دلیل این افزایش را می توان به افزایش بار الکتریکی مولکول های پروتئین که سبب افزایش انعطاف پذیری بین ملکول های پروتئین و تضعیف بر هم کش های هیدروفوبی بین آنها می شود، نسبت داد. روند تغییرات ظرفیت کف‌کنندگی با تغییرات pH تقریبا مشابه تغییرات حلالیت پروتئین در دامنه pH مشابه بود که این امر ارتباط بین میزان حلالیت پروتئین و ظرفیت کف‌کنندگی را تایید می نماید. فیضی و همکاران (۲۰۱۵) نیز حداقل ظرفیت کف‌کنندگی ایزوله پروتئینی استخراج شده به روش قلیایی از دانه شنبلیله را در pH معادل ۴/۵ به میزان ۳۱ درصد گزارش کردند در حالی که بالاترین

### ۳-۶- ظرفیت کف‌کنندگی و پایداری کف

کف نوعی دیسپرسیون است که در آن یک فاز آبی یا نیمه جامد به عنوان فاز پیوسته، فاز گازی را به عنوان فاز پراکنده در بر می گیرد و تأثیر بسزایی در تولید فراورده هایی نظیر انواع موس و نوشیدنی‌ها دارد [۶۰]. تشکیل کف به واسطه وقوع سه مکانیسم انتقال، نفوذ و بازآرایی مولکول‌ها در حد فاصل هوا و آب صورت می پذیرد. این فرایندها تحت تأثیر آب دوستی سطحی، اندازه و انعطاف ساختاری سورفکتانت است [۶۱]. ظرفیت کف‌کنندگی و پایداری کف پروتئین شنبلیله به دست آمده به کمک امواج فراصوت در شکل ۵ (الف و ب) آورده شده است. بر اساس نتایج تجزیه و تحلیل آماری تغییرات pH تأثیر معنی داری بر ظرفیت کف‌کنندگی و پایداری کف پروتئین شنبلیله داشت ( $p < 0.05$ ). کمترین ظرفیت کف‌کنندگی (۴۴/۶۶ درصد) در pH معادل ۴/۵ و بیشترین ظرفیت کف‌کنندگی (۹۲/۴۹ درصد) در pH معادل ۱۰ مشاهده شد.

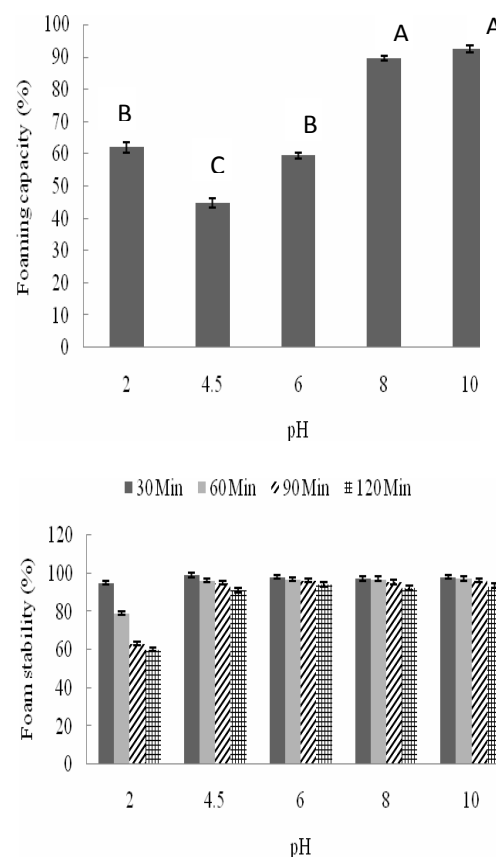
۱۰ در زمان‌های ۳۰ تا ۱۲۰ دقیقه مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاکی از آن است که با ثابت در نظر گرفتن pH گذشت زمان سبب کاهش معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) پایداری کف می‌شود. بیشترین میزان پایداری کف مربوط به pH معادل ۴/۵ و زمان ۳۰ دقیقه بود. فیضی و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند که بیشترین مقدار پایداری کف با استفاده از ایزوله پروتئینی شنبلیله استخراج شده به روش قلیایی در pH معادل ۴/۵ قابل دستیابی (حدود ۸۸-۱۰۰ درصد در زمان‌های ۳۰ و ۱۲۰ دقیقه) است و دلیل آن را به صفر بودن بار الکتریکی در نقطه ایزوالکتریک، ایجاد تعاملات آب‌گریز بین مولکول‌های پروتئین و ایجاد یک لایه ویسکوز و پایدار اطراف مولکول‌های هوا بیان کردند [۱۷]. نتایج جین و آنال (۲۰۱۶) حاکی از آن است که اعمال فراصوت سبب افزایش معنی‌دار در ظرفیت کف‌کنندگی و پایداری کف می‌گردد. آن دلیل این امر را انتقال سریع پروتئین‌ها به سطح بین هوا-آب و باز شدن تاخوردگی و فرارگیری آن در مابین دو سطح دانسته‌اند که اعمال فراصوت سبب افزایش انعطاف پذیری پروتئین‌ها از طریق در معرض قرار گرفتن بیشتر بخش‌های آب‌گریز می‌شود [۵۰].

### ۳-۷- ظرفیت امولسیون‌کنندگی و پایداری

#### حرارتی امولسیون

پروتئین‌ها از آمینواسیدهای باردار، قطبی بدون بار و غیرقطبی تشکیل شده‌اند و از طرفی با داشتن هر دو خصوصیت آب‌دوستی و آب‌گریزی آنها را قادر ساخته تا بتوانند به حدفاصل اتصال آب و روغن در سیستم غذایی متصل شود [۶۴]. این عوامل باعث شده‌اند پروتئین‌ها از طریق کاهش تنش بین سطحی کارآیی مناسب به عنوان امولسیون‌کننده از خود نشان دهند [۶۵]. در حالی که پایداری امولسیون به ظرفیت پروتئین‌ها برای باقی ماندن در حدفاصل روغن و آب پس از نگهداری یا حرارت دیدن امولسیون اطلاق می‌شود. از آنجایی که ظرفیت امولسیون‌کنندگی پروتئین‌ها وابسته به حلالیت و آب‌دوستی می‌باشد و اعمال فراصوت بر این دو پارامتر تأثیرگذار است لذا می‌توان بهبود ظرفیت امولسیون‌کنندگی پروتئین استخراج شده به کمک امواج فراصوت را محتمل دانست. ظرفیت امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون پروتئین شنبلیله به دست آمده به کمک امواج فراصوت در شکل ۶ (الف و ب) آورده شده است. بر اساس نتایج تجزیه و تحلیل آماری تغییرات pH تأثیر معنی‌داری بر ظرفیت

ظرفیت کف‌کنندگی در pH معادل ۸ و به میزان ۱۳۷/۶۷ درصد مشاهده شد [۱۷]. وانی و همکاران (۲۰۱۵) و مالیک و همکاران (۲۰۱۷) گزارش نمودند که با افزایش فاکتور آب‌دوستی به علت وجود پروتئین‌های محلول در اثر اعمال فراصوت از طریق کاهش کشش سطحی ظرفیت کف‌کنندگی افزایش می‌یابد [۵۲، ۶۲]. از طرفی باز شدن ساختار پروتئین‌ها و تعامل آنها با یکدیگر در مقیاس بین سطحی به این امر کمک بسزایی می‌نماید.



**Fig 5 (a)** Effect of pH changes on foaming capacity, (b) Effect of pH changes and time on foam stability of ultrasound - assisted extracted Fenugreek seed protein under optimized conditions.

The values with different superscript letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).

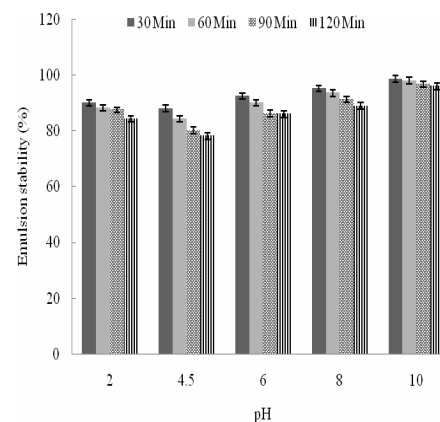
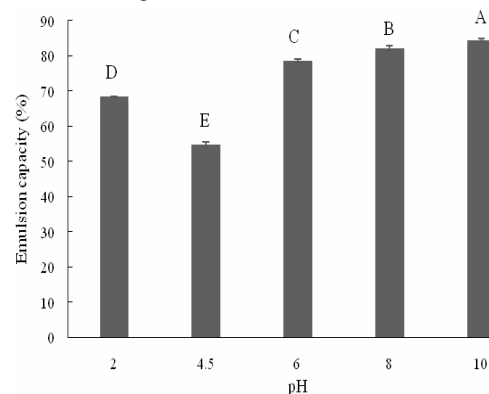
پایداری کف از طریق کاهش کشش بین سطحی مایع-گاز و یا تشکیل یک لایه پروتئین مقاوم با کشش پذیری بالا در اطراف حباب‌های گاز و یا تغییر گرانشی در فاز مایع حاصل می‌گردد [۶۳]. بدین منظور میزان پایداری کف در دامنه pH معادل ۲-

مالیک و همکاران (۲۰۱۷) افزایش پایداری امولسیون حاوی پروتئین‌های سویا و آفتابگردان تحت تاثیر فراصوت را کاهش اندازه پپتیدها و تا اندازه‌ای باز شدن تاخوردگی پروتئین‌ها بیان کردند که این امر باعث انتقال و اتصال سریع‌تر پروتئین در سطح بین آب و روغن و در نتیجه بهبود ظرفیت امولسیون‌کنندگی می‌شود [۵۱، ۵۲]. بیشترین پایداری امولسیون در pH برابر ۱۰ حاصل شد و با گذشت زمان از پایداری امولسیون به طور معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) کاسته شد (شکل ۶-ب). فیضی و همکاران (۲۰۱۵) بالاترین میزان پایداری امولسیون حاوی پروتئینی شنبلیله استخراج شده به روش قلیایی در pH معادل ۸ را به میزان حدوداً ۱۰۰ درصد گزارش کردند در حالی که کمترین میزان پایداری در pH های ۴/۵ و ۳ به دست آمد [۱۷]. آنها دلیل کاهش پایداری امولسیون در طول زمان را افزایش تماس بین قطرات روغن و بهم پیوستن آنها و دلیل کاهش پایداری امولسیون در pH نقطه ایزوالکتریک را کاهش نیروهای دافعه بین مولکول‌های پروتئین بیان کردند.

### ۳-۸- بررسی میزان فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH

رادیکال‌های آزاد DPPH می‌توانند هیدروژن را برای تولید یک مولکول پایدار DPPH بپذیرند؛ بنابراین رنگ محلول حاوی رادیکال‌های آزاد DPPH به‌طور معنی‌داری از بنفش به زرد روشن تبدیل شده و میزان جذب را در ۵۱۷ نانومتر کاهش می‌دهد [۶۶]. فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH توسط پروتئین شنبلیله و آسکوربیک اسید به‌عنوان یک ضد اکساینده طبیعی در غلظت‌های مختلف در جدول ۵ نشان داده شده است. تمام نمونه‌ها دارای اثر مهارکنندگی در برابر رادیکال‌های آزاد DPPH بودند به طوری که با افزایش غلظت میزان فعالیت مهارکنندگی نیز افزایش یافت. بر اساس نتایج به دست آمده آسکوربیک اسید فعالیت مهارکنندگی قوی‌تری در مقایسه با پروتئین شنبلیله از خود نشان داد، باین‌حال این پروتئین شنبلیله نیز به عنوان یک محصولات طبیعی دارای توانایی چشمگیری در مهار رادیکال‌های آزاد DPPH می‌باشد. سازوکار احتمالی توانایی مهار رادیکال آزاد توسط نمونه‌های مورد مطالعه ممکن است با انتشار الکترون یا انتقال هیدروژن به رادیکال‌های آزاد از گروه‌های مختلف هیدروکسیل موجود در ساختار پروتئین مرتبط باشد و در نتیجه می‌تواند واکنش زنجیره‌ای رادیکال‌های آزاد را متوقف کند.

امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون پروتئین شنبلیله داشت ( $p < 0.05$ ). این امر را می‌توان به تغییر تعادل آب‌دوستی-آب‌گریزی مولکول‌های پروتئین در pH های مختلف مرتبط دانست. بیشترین ظرفیت امولسیون‌کنندگی پروتئین شنبلیله استخراج شده به کمک امواج فراصوت در pH های قلیایی خصوصاً pH ۱۰، به میزان ۸۴/۵۳ درصد حاصل شد در حالی که کمترین میزان ظرفیت امولسیون‌کنندگی (۵۴/۸۲ درصد) به دلیل کاهش حلالیت پروتئین و انعطاف پذیری آن در pH نقطه ایزوالکتریک مشاهده شد (شکل ۶-الف).



**Fig 6 (a)** Effect of pH changes on emulsion capacity, **(b)** Effect of pH changes and time on emulsion stability of ultrasound - assisted extracted Fenugreek seed protein under optimized conditions.

The values with different superscript letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).

این یافته با نتایج حاصل از پژوهش لاول (۲۰۰۴) مطابقت دارد. بر خلاف نتایج این پژوهش، در مطالعه فیضی و همکاران (۲۰۱۵) بالاترین ظرفیت امولسیون‌کنندگی پروتئینی شنبلیله استخراج شده به روش قلیایی در pH معادل ۳ به میزان ۳۹ درصد به دست آمد [۱۷]. جمبراک و همکاران (۲۰۰۹) و

**Table 5** DPPHradical scavenging activity (%) of Fenugreek seed protein and ascorbic acid

| Concentration (mg/mL) |            |            | Source                 |
|-----------------------|------------|------------|------------------------|
| 1                     | 0.5        | 0.25       |                        |
| 63.28±1.00            | 54.37±1.18 | 52.85±1.34 | Fenugreek seed protein |
| 98.05±0.89            | 92.15±1.02 | 90.05±0.91 | Ascorbic acid          |

#### ۴- نتیجه گیری

پژوهش حاضر با هدف بهینه‌سازی متغیرهای مستقل شامل قدرت امواج فراصوت و زمان اعمال فراصوت موثر بر استخراج پروتئین از دانه شنبلیله، ارزیابی ساختار، ویژگی‌های عملکردی و فعالیت ضد اکسایشی پروتئین شنبلیله انجام شد. با توجه به نتایج بهینه‌سازی عددی، شرایط بهینه برای استخراج پروتئین شنبلیله به کمک فراصوت شامل قدرت امواج فراصوت معادل ۸۰ وات و زمان ۲۸/۳۹ دقیقه بود. در این شرایط حداکثر عملکرد پیش‌بینی شده ۸/۶۵ درصد بود. وجود پروتئین و ساختار پروتئین شنبلیله به ترتیب با روش طیف‌سنجی ماوراء بنفش و مادون قرمز مورد تأیید قرار گرفت. پروتئینی به دست آمده به کمک امواج فراصوت خصوصیات عملکردی مطلوبی از خود نشان دادند. به علاوه فعالیت ضد اکسایشی قابل قبولی برای پروتئین دانه شنبلیله مشاهده گردید که این امر به دلیل توانایی اهدای الکترون برای واکنش با رادیکال‌های آزاد می‌باشد. در نتیجه از امواج فراصوت می‌توان برای جداسازی پروتئین از دانه شنبلیله در مدت زمان کوتاه‌تر و با خصوصیات عملکردی مطلوب‌تر جهت استفاده در فرمولاسیون مواد غذایی استفاده نمود.

#### ۵- تقدیر و تشکر

مقاله حاضر حاصل سمینار کارشناسی ارشد خانم آلا قاسمی کیا دانش آموخته گرایش فناوری مواد غذایی، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی دانشگاه زنجان می‌باشد. از دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان که با فراهم آوردن امکانات تحقیق ما را یاری کردند، سپاسگزاری می‌نمایم.

#### ۶- منابع

- [2] Sikorski, Z. E. 2006. Chemical and functional properties of food components. CRC press.
- [3] El Nasri, N.A. and El Tinay, A.H. 2007. Functional properties of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) protein concentrate. Food Chemistry. 103: 582-589.
- [4] Oshodi, A.A. and Ojokan, E.O. 1997. Effect of salts on some of the functional properties of bovine plasma protein concentrate. Food Chemistry. 59(3): 333–338.
- [5] Arogundade, L. A. 2006. Functional characterization of Tef (*Eragrosticstef*) protein concentrate: Influence of altered chemical environment on its gelation, foaming, and water hydration properties. Food Hydrocolloids. 20: 831-838.
- [6] Bakhshi. M.F., Milani, E., Mortazavi, S.A. and Meshkani, S.M. 2013. Effect of extraction methods on functional properties of chickpea protein isolated. Iranian Journal of Food Science and Technology. 10(38): 11-20.
- [7] Du, M., Xie, J., Gong, B., Xu, X., Tang, W., Li, X., Li, C. and Xie, M. 2018. Extraction, physicochemical characteristics and functional properties of Mung bean protein. Food Hydrocolloids. 76: 131–140.
- [8] Feyzi, S., Milani, E. and Golimovahhed, Q.A. 2018. Grass pea (*Lathyrus sativus* L.) protein isolate: The effect of extraction optimization and drying methods on the structure and functional properties. Food Hydrocolloids. 74: 187–196.
- [9] Jarpa-Parra, M., Bamdad, F., Wang, Y., Tian, Z., Temelli, F., Han, J. and Chen, L. 2014. Optimization of lentil protein extraction and the influence of process pH on protein structure and functionality. LWT–Food Science and Technology. 57(2): 461–469.
- [10] Ruiz, G.A., Xiao, W., Van Boekel, M., Minor, M. and Stieger, M. 2016. Effect of extraction pH on heat-induced aggregation, gelation and microstructure of protein isolate from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). Food Chemistry. 209: 203–210.
- [1] Vojdan, F. 1996. Methods of testing protein functionality. Solubility. pp.11- 27. In: G. M. Hall (Ed.). Blackie academic and Professional. London.

- [21] Safaryan, M.J., Ganjloo, A., Bimakr, M. and Zarringhalami, S. 2016. Optimization of ultrasound-assisted extraction, preliminary characterization and in vitro antioxidant activity of polysaccharides from green pea pods. *Foods*. 5(4): 1-15.
- [22] Bimakr, M., Ganjloo, A. and Noroozi, A. 2019. Effect of acoustic cavitation phenomenon on bioactive compounds release from *Eryngium caucasicum* leaves. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 13(3): 1839 - 1851.
- [23] Bimakr, M., Rahman, R.A., Ganjloo, A., Taip, F.S., Adzahan, N.M. and Sarker, M.Z.I. 2016. Characterization of valuable compounds from winter melon (*benincasa hispida* (thunb.) cogn.) seeds using supercritical carbon dioxide extraction combined with pressure swing technique. *Food and Bioprocess Technology*. 9(3): 396 - 406.
- [24] Bimakr, M., Ghoreishi, S.M., Ganjloo, A. and Mousavi, M. 2019. Modified supercritical carbon dioxide extraction of biologically active compounds from *Feijoa Sellowiana* leaves. *International Journal of Food Engineering*. 15(7): 20180342.
- [25] Luque-Garcia, J.L. and De Castro, M.L. 2003. Ultrasound: A powerful tool for leaching TrAC Trends in Analytical Chemistry. 22(1): 41-47.
- [26] Maran, J. P., Mekala, V. and Manikandan, S. 2013. Modeling and optimization of ultrasound-assisted extraction of polysaccharide from *Cucurbita moschata*. *Carbohydrate Polymers*. 92(2): 2018-2026.
- [27] Pico, Y. 2013. Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 43: 84-99.
- [28] Vilku, K., Manasseh, R., Mawson, R. and Ashokkumar, M. 2011. Ultrasonic recovery and modification of food ingredients. In *Ultrasound technologies for food and bioprocessing* (pp. 345-368). Springer, New York, NY.
- [29] Preece, K. E., Hooshyar, N., Krijgsman, A., Fryer, P.J. and Zuidam, N.J. 2017. Intensified soy protein extraction by ultrasound. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. 113: 94-101.
- [30] Yu, X., Gouyo, T., Grimi, N., Bals, O. and Vorobiev, E. 2016. Ultrasound enhanced aqueous extraction from rapeseed
- [11] Feyzi, S., Varidi, M., Zare, F. and Varidi, M.J. 2015. Fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) seed protein isolate: extraction optimization, amino acid composition, thermo and functional properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 5(15): 3165-3176.
- [12] Srinivasan, K. 2006. Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*): a review of health beneficial physiological effects. *Food-Reviews-International*. 22: 203-224.
- [13] Leela, N.K. and Shafeekh, K.M. 2008. Fenugreek, In V.A. Parthasarathy., Chempakam, B., and Zachariah, T. J. *Chemistry of spices*, CAB International. London.
- [14] Wani, S.A. and Kumar, P. 2018. Fenugreek: A review on its nutraceutical properties and utilization in various food products. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. 17(2): 97-106.
- [15] Fowler, M.J. 2007. Diabetes treatment, part 1: diet and exercise. *Clinical Diabetes* 25(3): 105-109.
- [16] Gupta, A., Gupta, R. and Lal, B. 2001. Effect of *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) seeds on glycaemic control and insulin resistance in type 2 diabetes. *Journal of The Association of Physicians of India*. 49: 1057-1061.
- [17] Feyzi, S., Varidi, M., Zare, F. and Varidi, M.J. 2015. Effect of pH changes on functional properties of fenugreek protein isolate. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. 11(5): 521-534.
- [18] Phongthai, S., Lim, S.T. and Rawdkuen, S. 2016. Optimization of microwave-assisted extraction of rice bran protein and its hydrolysates properties. *Journal of Cereal Science*. 70: 146-154.
- [19] Sarkis, J.R., Boussetta, N., Blouet, C., Tessaro, I.C., Marczak, L.D.F. and Vorobiev, E. 2015. Effect of pulsed electric fields and high voltage electrical discharges on polyphenol and protein extraction from sesame cake. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 29: 170-177.
- [20] Alvarez, C., Lélou, P., Lynch, S.A. and Tiwari, B.K. 2018. Optimised protein recovery from mackerel whole fish by using sequential acid/alkaline isoelectric solubilization precipitation (ISP) extraction assisted by ultrasound. *LWT-Food Science and Technology*. 88: 210-216.

- protein isolates. *Food/Nahrung*. 45(4): 258–262.
- [41] Xie, J.H., Shen, M.Y., Xie, M.Y., Nie, S.P., Chen, Y., Li, C., DF, H. and Wang, Y.X. 2012. Ultrasonic-assisted extraction, antimicrobial and antioxidant activities of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*. 89(1): 177–184.
- [42] Tian, Y., Zeng, H., Xu, Z., Zheng, B., Lin, Y., Gan, C. and Lo, Y. 2012. Ultrasonic-assisted extraction and antioxidant activity of polysaccharides recovered from white button mushroom (*Agaricus bisporus*). *Carbohydrate Polymers*. 88(2): 522–529.
- [43] Wei, F., Gao, G.Z., Wang, X.F., Dong, X.Y., Li, P.P., Hua, W., Wang, X., Wu, X.M. and Chen, H. 2008. Quantitative determination of oil content in small quantity of oilseed rape by ultrasound-assisted extraction combined with gas chromatography. *Ultrasonics Sonochemistry*. 15: 938–942.
- [44] Zhao, S., Kwok, K.C. and Liang, H.H. 2007. Investigation on ultrasound assisted extraction of saikosaponins from *Radix Bupleuri*. Separation and Purification Technology. 55: 307–312.
- [45] Zhu, K.-X., Sun, X.-H. and Zhou, H.-M. 2009. Optimization of ultrasound-assisted extraction of defatted wheat germ proteins by reverse micelles. *Journal of Cereal Science*. 50: 266–271.
- [46] Yang, Y., Cui, S.W., Gong, J., Guo, Q., Wang, Q. and Hua, Y. 2015. A soy protein-polysaccharides Maillard reaction product enhanced the physical stability of oil-in-water emulsions containing citral. *Food Hydrocolloids*. 48: 155–164.
- [47] Chen, X., Ru, Y., Chen, F., Wang, X., Zhao, X. and Ao, Q. 2013. FTIR spectroscopic characterization of soy proteins obtained through AOT reverse Micelles. *Food Hydrocolloids*. 31: 435–437.
- [48] Silverstein, R. M., Bassler, G. C. and Morrill, T.C. 1981. Infrared spectroscopy. In *Spectrometric identification of organic Compounds* (pp. 95–137). New York: John Wiley and Sons.
- [49] Dong, X., Guo, L., Wei, F., Li, J., Jiang, M., Li, G.M., Zhao, Y.D. and Chen, H. 2011. Some characteristics and functional properties of rapeseed protein prepared by ultrasonication, ultrafiltration and isoelectric green biomass for polyphenol and protein valorization. *Comptes Rendus Chimie*. 19(6): 766–777.
- [31] Jiang, L.Z., Wang, J., Li, Y., Wang, Z.J., Liang, J., Wang, R., Ma, W., Qi, B., Zhang, M. and Chen, Y. 2014. Effects of ultrasound on the structure and physical properties of black bean protein isolates. *Food Research International*. 62: 595–601.
- [32] Hu, H., Wu, J., Li-Chan, E.C., Zhu, L., Zhang, F. and Xu, X. 2013. Effects of ultrasound on structural and physical properties of soy protein isolate (SPI) dispersions. *Food Hydrocolloids*. 30(2): 647–655.
- [33] Higuera-Barraza, O.A., Del Toro-Sanchez, C.L., Ruiz-Cruz, S. and Márquez-Ríos, E. 2016. Effects of high-energy ultrasound on the functional properties of proteins. *Ultrasonics Sonochemistry*. 31: 558–562.
- [34] Amza, T., Amadou, I., Zhu, K. and Zhou, H. 2011. Effect of extraction and isolation on physicochemical and functional properties of an underutilized seed protein: Gingerbread plum (*Neocarya macrophylla*). *Food Research International*. 44(9): 2843–2850.
- [35] Chen, Y., Luo, H., Gao, A. and Zhu, M. 2011. Ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) seed by response surface methodology and their structural characteristics. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 12(3): 305–309.
- [36] Bera, M.B. and Mukherjee, M.R.K. 1989. Solubility, emulsifying, and foaming properties of rice bran protein concentrates. *Journal of Food Science*. 54: 142–145.
- [37] Owusu-Apenten, R.K. 2002. *Food protein analysis: quantitative effects on processing*. Marcel Dekker, Inc: New York.
- [38] Beuchat, L.R. 1977. Functional and electrophoretic characteristics of succinylated peanut flour protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 25(2): 258–261.
- [39] Coffmann, C.W. and Garciaj, V.V. 1977. Functional properties and amino acid content of a protein isolate from mung bean flour. *International Journal of Food Science & Technology*. 12(5): 473–484.
- [40] Neto, V.Q., Narain, N., Silva, J.B. and Bora, P.S. 2001. Functional properties of raw and heat processed cashew nut (*Anacardium occidentale* L.) kernel

- properties of bambarra groundnut (*Voandzeia subterranean*), jack bean (*Canavalia ensiformis*) and mucuna bean (*Mucuna pruriens*) flours. *Food Research International*. 37(4): 355–365.
- [60] Nasrollahzadeh, F., Varidi, M., Koocheki, A. and Hadizadeh, F. 2017. Effect of microwave and conventional heating on structural, functional and antioxidant properties of bovine serum albumin-maltodextrin conjugates through Maillard reaction. *Food Research International*. 100: 289–297.
- [61] Wilde, P.J. and Clark, D.C. 1996. The competitive displacement of  $\beta$ -lactoglobulin by tween 20 from oil-water and air-water interfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*. 155: 48–54.
- [62] Wani, I.A., Sogi, D.S. and Gill, B.S. 2015. Physico-chemical and functional properties of native and hydrolyzed protein isolates from Indian black gram (*Phaseolus mungo* L.) cultivars. *LWT-Food Science and Technology*. 60(2): 848–854.
- [63] Aremo, M.O. and Olaofe, O. 2007. Functional properties of some Nigerian varieties of legume seed flours and flour concentration effect on foaming and gelation properties. *Journal of Food Technology*. 5(2): 109–115.
- [64] Yu, J., Ahmedna, M. and Goktepe, I. 2007. Peanut protein concentrate: Production and functional properties as affected by processing. *Food Chemistry*. 103(1): 121–129.
- [65] Sarkar, A., Goh, K.T. and Singh, H. 2010. Properties of oil-in-water emulsions stabilized by  $\beta$ -lactoglobulin in simulated gastric fluid as influenced by ionic strength and presence of mucin. *Food Hydrocolloids*. 24: 534–541.
- [66] Feng, S., Cheng, H., Fu, L., Ding, C., Zhang, L., Yang, R. and Zhou, Y. 2014. Ultrasonic-assisted extraction and antioxidant activities of polysaccharides from *Camellia oleifera* leaves. *International Journal of Biological Macromolecules*. 68: 7–12.
- precipitation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 91(8): 1488–1498.
- [50] Jain, S. and Anal, A.K. 2016. Optimization of extraction of functional protein hydrolysates from chicken egg shell membrane (ESM) by ultrasonic assisted extraction (UAE) and enzymatic hydrolysis. *LWT-Food Science and Technology*. 69: 295–302.
- [51] Jambrak, A.R., Lelas, V., Mason, T.J., Krešić, G. and Badanjak, M. 2009. Physical properties of ultrasound treated soy proteins. *Journal of Food Engineering*. 93: 386–393.
- [52] Malik, M.A., Sharma, H.K. and Saini, C.S. 2017. High intensity ultrasound treatment of protein isolate extracted from dephenolized sunflower meal: Effect on physicochemical and functional properties. *Ultrasonics Sonochemistry*. 39: 511–519.
- [53] Connolly, A., Piggott, C.O. and FitzGerald, R.J. 2014. Technofunctional properties of a brewers' spent grain protein-enriched isolate and its associated enzymatic hydrolysates. *LWT-Food Science and Technology*. 59(2): 1061–1067.
- [54] Bhaskaracharya, R.K., Kentish, S. and Ashokkumar, M. 2009. Selected Applications of Ultrasonic in Food Processing. *Food Engineering Reviews*. 1: 31–49.
- [55] Hu, H., Fan, X., Zhou, Z., Xu, X., Fan, G., Wang, L., Huang, X., Pan, S. and Zhu, L. 2013. Acid induced gelation behavior of soybean protein isolate with high intensity ultrasonic pre-treatments. *Ultrasonics Sonochemistry*. 20: 187–195.
- [56] Seena, S. and Sridhar, K.R. 2005. Physicochemical, functional and cooking properties of *Canavalia*. *Food Chemistry*. 32: 406–412.
- [57] Kinsella, J.E. 1982. Relationships between structure and functional properties of food proteins. *Food Proteins*. 1: 51–103.
- [58] Kaur, M. and Singh, N. 2007. Characterization of protein isolates from different Indian chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. *Food Chemistry*. 102: 366–374.
- [59] Adebowale, K.O. and Lawal, O.S. 2004. Comparative study of the functional





## Optimization of Ultrasound-assisted Extraction of Fenugreek Seed Protein and Evaluation of Its Structural, Functional Properties and Antioxidant Activity

Ghasemi Kia, A. <sup>1</sup>, Ganjloo, A. <sup>2\*</sup>, Bimakr, M. <sup>2</sup>

1. MSc of Food Technology, Department of Food Science and Engineering, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran.
2. Associate Professor, Department of Food Science and Engineering, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran.

### ABSTRACT

Proteins are one of the most important food constituents due to their unique functional properties and health benefits. Among plant proteins, fenugreek seed protein is of great interest due to its high content of essential amino acids. The current study was carried out to optimize ultrasound-assisted extraction of fenugreek seed protein and evaluation of its functional, structural and antioxidant properties. The optimal conditions for protein extraction were ultrasonic power of 80 W and sonication time of 28.39 min which under these conditions, the predicted extraction yield was 8.65% which was in good agreement with the experimental value (8.57%). Amide A, amides type I, II, and III bands were observed in Fourier transform infrared spectrum. The solubility was pH-dependent. The water and oil absorption capacity was 6.24 and 2.72 mL/g, respectively. The lowest (44.66%) and highest (92.49%) foaming capacities were observed at pH 4.5 and 10, respectively. The highest emulsifying capacity (84.53%) was observed at pH 10, while the lowest (54.82%) was at isoelectric point. At the constant pH, the foam and emulsion stability decreased over time. The results revealed that ultrasound can be applied effectively to reduce the time of protein extraction process from fenugreek seeds. In addition, the fenugreek seeds extracted by using ultrasound have desirable functional and antioxidant properties that make it feasible for utilization in the food industry.

### ARTICLE INFO

#### Article History:

Received 2021/ 11/ 24  
Accepted 2022/ 05/ 23

#### Keywords:

Extraction,  
Response surface methodology,  
Fourier transform infrared spectroscopy,  
Protein solubility,  
Foaming capacity.

**DOI:** 10.22034/FSCT.19.126.39

**DOR:** 20.1001.1.20088787.1401.19.126.14.5

\*Corresponding Author E-Mail:  
[aganjloo@znu.ac.ir](mailto:aganjloo@znu.ac.ir)