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

جلال محمدزاده[1*] ، علیر ضا قدس ولی [2]

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: ٩٤/٠٦/٢٢ تاریخ پذیرش: ٩٥/٠٤/١٩)

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 تاثیر گذار باشد. لذا در این تحقیق از روش سطح پاسخ و طرح مرکب مرکزی به منظور بررسی تاثیر 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، ۹۴ /۰، 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 کف کنندگی فقط متاثر 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، ۴۱،۱۸۵، ٦٤ و ١٦٥ درصد بود.

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

* مسئول مکاتبات: jmohamadzadeh@yahoo.com

۱- مقدمه

افزایش جمعیت، بهبود سطح تغذیه وافزایش 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 سال های 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 فراورده‌های 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. خصوصیاتی 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 فراورده‌های غذایی می‌باشد [۳]. استخراج پروتئین از کنجاله کلزا و خواص فیزیکو 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 [٤]. 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 [٦ 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 می تواند به عنوان یک عامل قابل کنترل جهت تغییر خواص ایزوله پروتئینی کلزا عمل نماید [۵]. ژو و دیوسدی[1] 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 تخم‌مرغ) و خاصیت امولسیون کنندگی متوسط بود. آنان دریافتند حلالیت و قدرت کف کنندگی پروتئین تحت تأثیر اسید فیتیک بوده و جدا شدن فیتات ها نیز به مقدار زیادی به تغییرات pH بستگی دارد [۹]. نتایج بررسی دیگری در رابطه با تاثیر pH برخواص 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 ۳/٦ بالاتر بود [۲]. بررسی رفتار اجزاء عمده ایزوله پروتئینی کلزا (گلوبولین[2] و آلبومین[3]) 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 فراورده‌های غذایی مختلف به دست آید.

۲- مواد و روش‌ها

نمونه کلزا مورد بررسی رقم غالب منطقه استان گلستان (رقم هایولا[4]) بود که با مدیریت زراعی مناسب و کنترل شده در ایستگاه تحقیقاتی گرگان کشت شد. نمونه‌ها پس از جداسازی ناخالصی ها 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 بااتانول، 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 ٦۰ 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)،۳۸/ ٤ 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 می گردد) سپس بخش نامحلول حاصل، توسط سانتریفیوژ(*g*× ٤۰۰۰ 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 ٦ مولار به محدوده نقطه ایزوالکتریک در pH اسیدی رسانده شد و طیف pH (٤/۵-٦/۵) مورد بررسی قرار گرفت. سپس پروتئین رسوب کرده از هر شرایط در *g*× ٤۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و جهت خلوص بالاتر ۵ مرتبه با آب مقطر شستشو و صاف گردید. پروتئین رسوبی حاصل در شرایط آون تحت خلاء در دمای ٦۵ 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 آون ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت، تعیین چربی از روش سوکسله، تعیین پروتئین از روش کلدال(٦/۲۵ × N) [۱۱]، مقدار فیبر خام کنجاله [۱۱]، مقدار فیتات براساس روش تیتراسیون فبلز[5] [۱۲] و میزان گلوکوزینولات طبق روش وتر و یانگ[6] [۱۳]، اندازه‌گیری شد.

۲-٤- اندازه‌گیری خواص عملکردی پروتئین

۲-٤-۱- ظرفیت جذب آب

۲ گرم نمونه پروتئینی با ۱٦ 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 g×۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد. ظرفیت جذب آب بر حسب درصد افزایش وزن نمونه اندازه گیری شد [۵].

۲-٤-۲- 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 g×۱٦۰۰ سانتریفیوژ شد. ظرفیت جذب روغن بر حسب درصد افزایش وزن نمونه اندازه گیری شد [۵].

۲-٤-۳- اندیس حلالیت نیتروژن

۵گرم از نمونه را در یک بشر ٤۰۰ 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].

۱۰۰ × (نیتروژن کل/ نیتروژن محلول در آب) = ٪ حلالیت نیتروژن

۲-٤-٤- ظرفیت امولسیون کنندگی

۳ گرم ایزوله پروتئینی با ۷۵ میلی لیتر آب برای مدت ۳۰ ثانیه کاملا مخلوط شده و سپس ۲۵ میلی لیتر روغن ذرت افزوده و مجددا 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 rpm ۵۰۰۰ هم زده شد. امولسیون حاصل به مدت ۲ دقیقه در g × ۱۰۰۰ سانتریفیوژ گردید (ارتفاع امولسیون با استفاده از خط کش مدرج اندازه گیری شد) [۸].

ظرفیت امولسیون کنندگی = (ارتفاع لایه امولسیفیه پس از سانتریفیوژ / ارتفاع کل محلول قبل از سانتریفیوژ) × ۱۰۰

۲-٤-۵- 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 (rpm ۳۰۰۰) هم زده شد و بلافاصله حجم محلول ثبت شد [۲].

ظرفیت کف کنندگی = (حج محلول قبل از هم خوردن − حجم محلول بعد از هم خوردن) / 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،۱۰و۱۲) و pH ترسیب (٤/٥، ٥/٥ و ٦/٥) برای تعیین شرایط بهینه استفاده شد. داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار (Design Expert) مدل سازی شده و منحنی‌های سطح پاسخ جهت بررسی رابطه میان پاسخ‌ها و متغیرهای مستقل رسم شد. داده-های 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 ٤٣/٥ درصد بود لازم به ذکر است مقدار پروتئین کنجاله درارقام مختلف در دامنه ٣٦-٤٥٪ 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

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 ٦ 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

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 معنی‌دار 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 معنی‌دار نبود.

Table 2 Coded levels and actual values of the variables in centeral 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

با توجه به نتایج به دست آمده از تحلیل واریانس مدل سطح پاسخ چند جمله ای درجه دوم گزینش و بر داده‌های پاسخ برازش شد (جدول ۲). مقدار R^2، برای میزان راندمان، جذب آب، جذب چربی، شاخص حلالیت، ظرفیت امولسیون کنندگی

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 معنی‌داری به مدل اضافه نشده است.

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 معنی‌دار است ($P <۰/۰۰۱$).

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

		Protein Yield			Water absorption			Fat absorption		
Source	DF	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	
R^2		**0.98**			**0.94**			**0.91**		
R^2-Adj		**0.97**			**0.91**			**0.88**		

Continued Table 3

		Nitrogen Solubility Index			Emulsifying Capacity			Foaming capacity		
Source	DF	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	
R^2		**0.92**			**0.90**			**0.93**		
R^2-Adj		**0.88**			**0.86**			**0.89**		

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 باز شدن برخی پروتئین‌ها) در pH حدود ۱۲ بالاتر می‌باشد. کومبای[۷] 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 [١٤].

7. Cumby

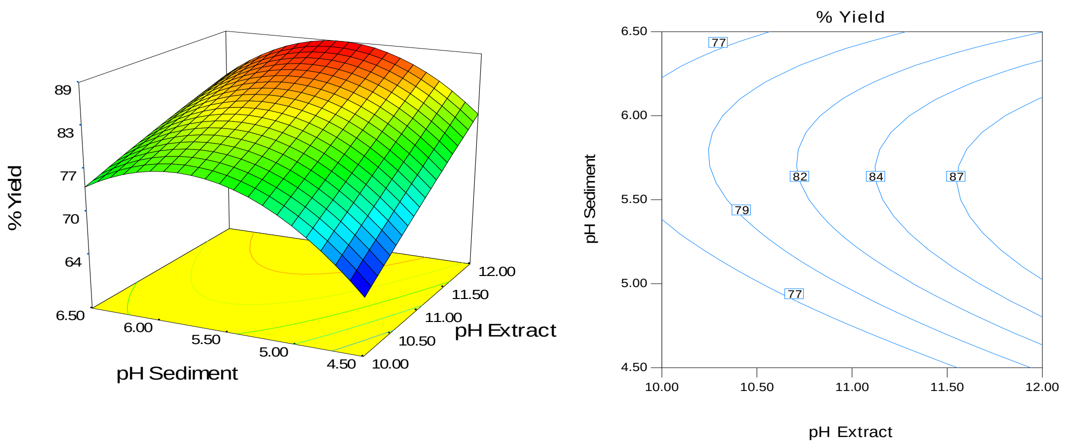

Fig 1 Contour plot and 3D response surface curves for the effect of extraction and precipitation conditions on the protein yield

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 می کنند. 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 ٦/٥ 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 pH ترسیب تا حدود ۵/۵ راندمان بطور معنی داری افزایش یافته و از آن به بعد علی رغم افزایش pH استخراج، راندمان کاهش یافت. جرژوا و همکاران نیز در بهینه سازی شرایط تهیه ایزوله پروتئینی کانولا بیشترین راندمان را pH استخراج برابر ۱۲ و رسوب پروتئین در pH برابر ۵ گزارش کردند که به نتایج این تحقیق نزدیک است[۱۵].

۳-٤- 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 ٤/٥ حاصل شده است** (شکل ۲). در مورد عامل pH اسیدی با افزایش آن مقدار جذب آب روند افزایشی داشته و از pH حدود ٦ به صورت آهسته کاهش یافته است. ملاحظه می‌گردد روند تاثیر pH استخراج و ترسیب بر میزان جذب آب تقریبا مشابه اثر آن بر راندمان می‌باشد. pH محیط به علت تغییراتی که در میزان گروه های باردار، در سطح پروتئین به وجود می‌آورد به شکل مؤثری بر ویژگی های جذب آب پروتئین ها می‌تواند تأثیرگذار باشد [٦].

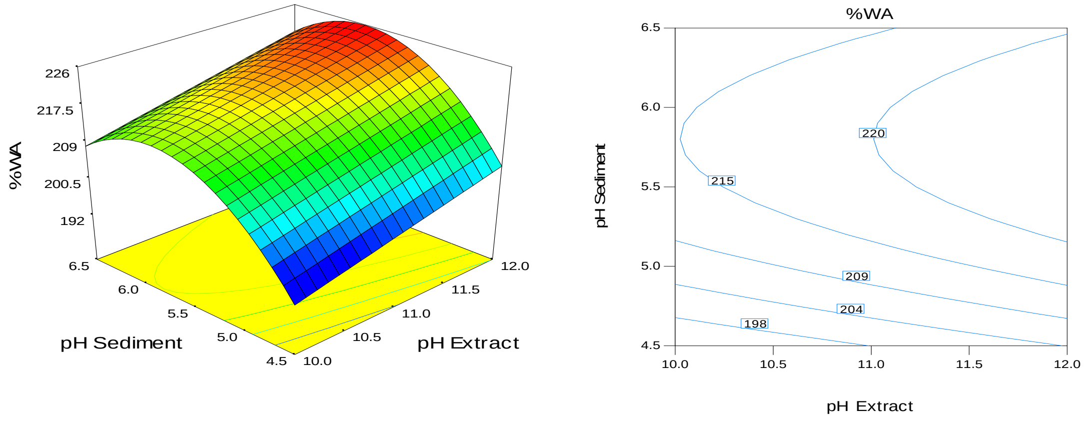

Fig 2 Contour plot and 3D response surface curves for the effect of extraction and precipitation conditions on the water absorption

جذب آب را باید مهمترین خصوصیت فیزیکی پروتئین ها دانست. این پدیده نه تنها بر ساختمان فیزیکی و خصوصیات فرایندی ماده غذایی حاوی پروتئین اثر می‌گذارد، بلکه از نظر فساد ماده غذایی (در فراورده 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 [٧]. ظرفیت جذب آب در مواد غذایی مختلف به ترکیب اسیدهای آمینه، آرایش فضایی پروتئین، میزان آبدوستی و آبگریزی پروتئین بستگی دارد [٥]. جذب آب ایزوله پروتئینی کلزا در شرایط pH استخراج برابر ١٢ و pH ترسیب برابر ٥/٥ به ٢٢٥ ٪ رسید که با مقدار جذب آب گزارش شده توسط مهاجان و دوآ[10] (٢٢٠ درصد) مطابقت دارد [١٦].

٣-٥- 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 ($P<$ ٠/٠٠١)، به طوری که با افزلیش pH استخراج میزان جذب چربی افزایش یافته است. با توجه به وجود انحنا در نمودار رویه سطح، بیشترین میزان جذب چربی در pH ترسیب ٥/٥ تا ٦ حاصل شده است و افزایش عامل pH استخراج در محدوده مذکور تاثیر مثبتی بر میزان جذب نداشته است (شکل٣).

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 زنجیره‌های جانبی هیدروکربنی روغن و همچنین شکل فضایی پروتئین نسبت داده شده است. مقدار جذب چربی پروتئین کلزا در دامنه ١٨٢٪-١٧١٪ متغیر می‌باشد که مقدار آن مناسب و قابل رقابت با پروتئین سویا (١٧٥٪) است. بنابراین جهت کاربرد در فراورده‌های گوشتی قابل توصیه است [٣ و ٥].

٣-٦- 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 حلالت 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 ٥/٥ به بعد کاهش نشان داده است. بطوریکه بیشترین حلالیت در pH استخراج ١٢ و pH ترسیب حدود ٥/٥ حاصل شده است (شکل ٤). حلالیت یکی از خواص عملکردی اصلی پروتئین است که کارائی مواد پروتئینی را کنترل می‌کند و می‌تواند بر سایر خواص عملکردی مانند خواص امولسیونی، کف زایی و ژلاتیناسیون نیز موثر باشد [١٧]. 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 [٢ و ٥]. اندیس حلالیت نیتروژن ایزوله پروتئینی کلزا با توجه به نتایج بدست آمده بین ٤٠ -٣٤٪ 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[١٨].

10. Mahajan & Dua

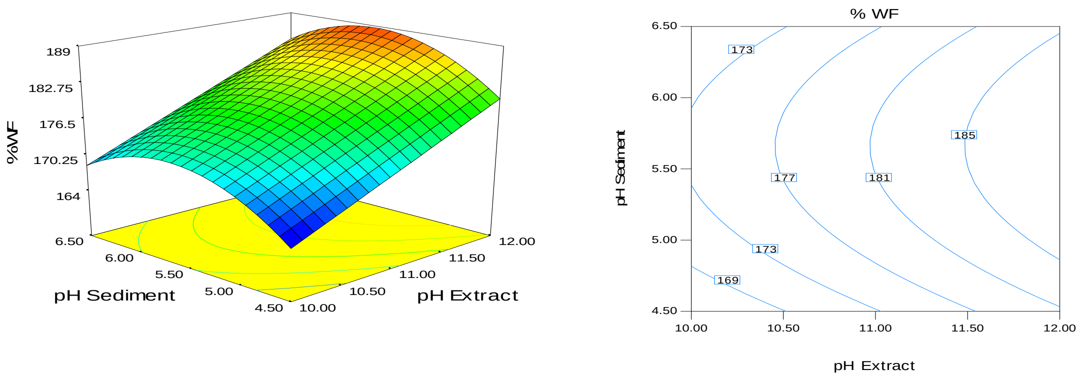

Fig 3 Contour plot and 3D response surface curves for the effect of extraction and precipitation conditions on the fat absorption

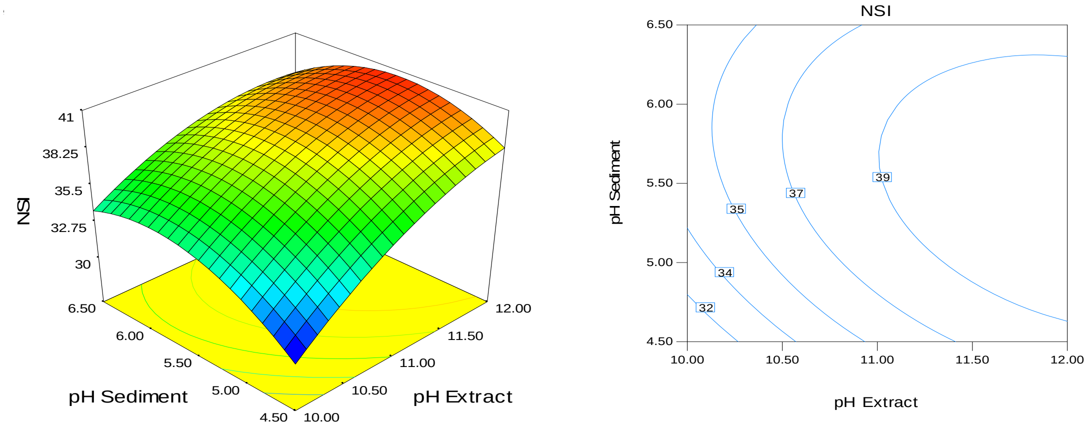

Fig4 Contour plot and 3D response surface curves for the effect of extraction and precipitation conditions on the nitrogen solobility index

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 ($P<۰/۰۰۱$) و اثر درجه دوم pH استخراج و pH ترسیب ($P<۰/۰۵$) بر ظرفیت امولسیون کنندگی ایزوله پروتئینی کلزا معنی دار می‌باشند. 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 ٦ 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-هیدروفیل 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. لذاجدا شدن فیتات ها به مقدار زیادی به تغییرات pH بستگی دارد و بر اساس نتایج ژو و دیوسدی در استخراج قلیایی با pH> ۱۱ فیتات ها 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 فراورده‌های 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

همه خواص عملکردی پروتئین از جمله امولسیون کنندگی وسطح هیدروفوب آن به طور قابل توجهی به pH محیط استخراج بستگی دارد که با نتایج این تحقیق همسو است [٢٠].

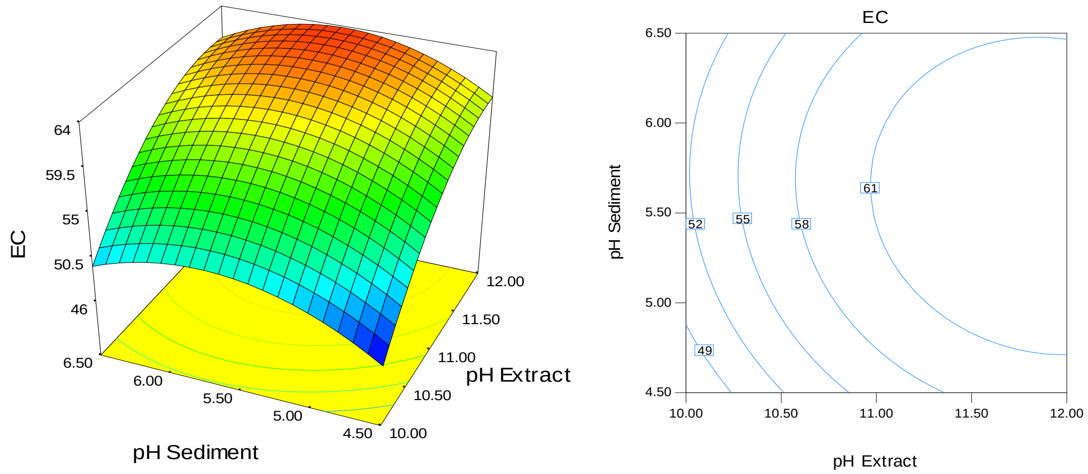

Fig 5 Contour plot and 3D response surface curves for the effect of extraction and precipitation conditions on the emulsifying Capacity

٣-٨- 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 نیزحاکی از آن بود که pH استخراج تاثیر زیادی بر تغییرات کف کنندگی پروتئین دارد. به طوری که در pH قلیایی بالاتر از ١١ ظرفیت کف کنندگی به طور چشم گیری افزایش یافته است. افزایش حلالیت پروتئین در pH قلیایی احتمالا به انعطاف پذیری پروتئین کمک کرده و مانع بر هم کنش‌های هیدروفوب-هیدروفوب بین مولکول‌های پروتئین می‌گردد [١٧]. به طور کلی تغییرات ظرفیت کف کنندگی هم جهت و متناسب با تغییرات حلالیت پروتئین می باشد. با توجه به معنی دار بودن اثر درجه دوم pH ترسیب و وجود انحنا در منحنی رویه پاسخ، تعیین میزان بیشینه پاسخ در محدوده انتخابی امکان پذیر بوده که در حدود pH برابر ٥/٥ می‌باشد (شکل٦).

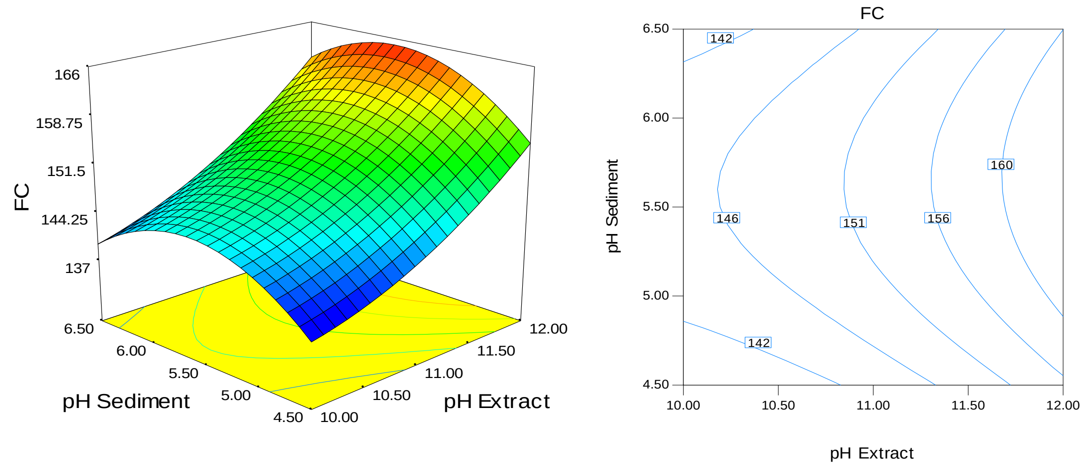

Fig 6 Contour plot and 3D response surface curves for the effect of extraction and precipitation conditions on the foaming Capacity

کف در مواد غذایی شامل پراکندگی حباب‌های 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، کیک‌های بدون روغن و بستنی نقش اساسی دارد [۱۶]. پروتئین‌ها با کاهش کشش سطحی و حفظ پایداری حباب به علت ایجاد فیلم چسبنده در سطح میانی آب-هوا می‌توانند نقش مهمی در تشکیل کف ایفا کنند. مهم ترین عاملی که سبب می‌شود 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 می‌باشد [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 کف‌کنندگی به ترتیب ۸۹، ۲۲۵، ۱۸۵، ٤۱، ٦٤ و ١٦٥ درصد به دست آمد. جهت تصدیق مدل، آزمایشات تاییدی نقاط بهینه در سه تکرار با اندازه گیری خواص عملکردی فوق صورت گرفت. متوسط بیشینه‌ی مقادیر جذب آب، جذب چربی، شاخص حلالیت نیتروژن، فعالیت امولسیون و ظرفیت کف‌کنندگی به ترتیب ۹۰/۱، ۲۲۰، ۱۸۳، ٤۰، ٦۵ و ۱۷۰ درصد حاصل شد که درجه تطبیق بالای مقادیر تجربی را با مقادیر پیش بینی شده نشان می‌دهد.

٤- نتیجه‌گیری

با توجه به طرح توسعه کشت دانه‌های روغنی بخصوص کلزا در کشور ما توجه به مسائل صنایع تبدیلی این محصول و استفاده بهینه از ضایعات و کنجاله آن از جایگاه ویژه‌ای برخوردار می‌باشد. نتایج نشان داد روش سطح پاسخ می‌تواند به طور موفقیت آمیزی در بهینه سازی عامل‌های 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 پاسخ‌ها 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 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 عامل‌های 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 characterstics 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.

[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. 200l . 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: jmohamadzadeh@yahoo.com