

بهینه یابی فرایند استخراج پروتئین لوبیا قرمز (*Phaseolus vulgaris* L.) با استفاده از روش شناسی سطح پاسخ

اسماعیل عطای صالحی^{۱*}، عصمت خوری^۱، امین حسین زاده^۲

۱- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان، ایران

۲- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۶/۰۵/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۷/۳۰)

چکیده

استخراج پروتئین از منابع گیاهی بدلیل ارزان و در دسترس بودن در مناطقی از دنیا که دسترسی به پروتئین های حیوانی محدود است، بسیار حائز اهمیت می باشد. لوبیا قرمز یکی از منابع خوب پروتئینی و حاوی پروفایل مناسبی از اسیدهای آمینه است که می تواند در این زمینه استفاده شود. در این پژوهش تاثیر نسبت های مختلف آب به آرد (۵، ۱۰ و ۱۵ برابر) و pH های مختلف (۸، ۱۰ و ۱۲) در مرحله استخراج قلیایی بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی ایزوله پروتئین لوبیا قرمز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان دهنده تاثیر معنی دار ($P < 0.05$) متغیرهای مستقل بر میزان راندمان، خلوص، خصوصیات امولسیون کنندگی، جذب چربی و آب و نیز رنگ کلی ایزوله پروتئین بود. بهینه یابی فرایند نشان داد که استفاده از نسبت ۱۵ برابر آب به آرد و pH برابر با ۸/۸ سبب تولید ایزوله پروتئین از لوبیا قرمز با راندمان ۱۲/۷۶ درصد و درجه خلوص ۸۴/۹۵ درصد شد. قدرت امولسیون کنندگی ایزوله پروتئینی حاصل ۲۱/۵ درصد، میزان جذب چربی ۲/۹ درصد، جذب آب ۱/۲ درصد و تغییر رنگ کلی ۴۶/۲۶ در سطح مطلوبیت ۰/۷۰۰ بود.

کلید واژگان: لوبیا قرمز، پروتئین، روش شناسی سطح پاسخ، خصوصیات فیزیکوشیمیایی

*مسئول مکاتبات: eatayesalehi@yahoo.com

۱- مقدمه

لوبیای قرمز (*Phaseolus vulgaris L.*) به صورت عمده در بسیاری از مناطق دنیا کشت شده و به عنوان یک غذای حاوی چربی کم و غنی از پروتئین مورد استفاده قرار می گیرد. معمولا ۲۰ تا ۳۰ درصد ماده خشک لوبیا قرمز را پروتئین تشکیل می دهد. به دلیل پروفایل مناسب اسیدهای آمینه، مصرف پروتئین لوبیا از سوی سازمان بهداشت جهانی^۱ و سازمان کشاورزی ملل متحد^۲ برای افراد جامعه توصیه و پیشنهاد شده است. همچنین پروتئین لوبیا قرمز دارای خصوصیات مناسب عملکردی از قبیل انحلال پذیری، پایداری کف، خصوصیات امولسیون کنندگی است که برای بهبود کیفیت غذاها ضروریست [۱ و ۲].

بخش عمده ای از ویژگی های عملکردی مربوط به پروتئینها است که در اثر برهمکنش آنها با یونها، حلال و سایر مولکولهای اطراف آنها از جمله ساکاریدها، لیپیدها و پروتئینهای دیگر ظاهر میشود. این ویژگیهای عملکردی در بسیاری از محصولات غذایی باعث تغییر در ظاهر، رنگ، آبدار بودن، احساس دهانی و بافت آنها شده و فرآیندهایی چون برش زنی، مخلوط کردن، چرخ کردن، تشکیل خمیر، کف زایی، شکل دهی و انتقال محصولات فرآوری شده را تحت تاثیر قرار میدهند [۱ و ۲].

تا کنون تحقیقات زیادی در رابطه با استخراج پروتئین از منابع مختلف گیاهی انجام گرفته است. دلیل این تحقیقات گسترده، فراوانی و ارزانی حبوبات بعنوان منبعی بالقوه از پروتئین برای مردم این کشورها می باشد که توانایی کمتری در تامین پروتئین از منابع دامی دارند [۳].

به طور کلی حبوبات نسبت به غلات دارای پروتئین بیشتری میباشد لذا تقاضا برای منابع ارزان قیمت پروتئین که بتوان در تولید مواد غذایی با ارزش افزوده از آن بهره برد، در سطح جهان روبه افزایش است [۴ و ۵ و ۶].

روش تک مرحله ای استخراج قلیایی پروتئین روشی ساده برای تولید پروتئین خالص با بازده بالا می باشد. این روش معمولا بر اساس استخراج در یک شرایط قلیایی نرمال و انحلال کامل پروتئینها در یک محلول قلیایی از آرد چربی گیری شده صورت می گیرد. ترکیبات نامحلول در این بخش

عمدتا کربوهیدراتها و سایر ترکیبات موجود از قبیل فیبر می باشد. در مرحله بعد pH محلول بدست آمده تا نقطه ایزوالکتریک پروتئین کاهش داده می شود تا پروتئین رسوب کند [۷].

در این پژوهش تاثیر نسبت های مختلف آب به آرد (۵، ۱۰ و ۱۵) و pH های (۸، ۱۰ و ۱۲) در مرحله استخراج قلیایی بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی ایزوله پروتئین لوبیا قرمز بررسی شد.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- مواد

لوبیا قرمز واریته *Phaseolus vulgaris L.* شناسایی شده توسط گروه پژوهشی گیاهشناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، از بازار محلی مشهد تهیه شد. اسید کلریدریک، سدیم هیدروکسید، هگزان نرمال، گلیسرول مورد استفاده، ساخت شرکت مرک آلمان بود.

۲-۲- روش تهیه ایزوله پروتئینی لوبیا قرمز

ابتدا دانه های سالم و عاری از ناخالصی لوبیا قرمز توسط آسیاب خانگی آرد شد. آرد حاصله توسط الک با مش ۵۰ غربال گردید. برای حذف چربی ابتدا آرد به نسبت ۱ به ۵ با حلال ان - هگزان (ساخت شرکت مرک آلمان) به مدت یک ساعت در دمای آزمایشگاه مخلوط شد. سپس مخلوط فوق را درون فالدکون ریخته و توسط سانتریفوژ (ساخت شرکت سیگمای آلمان) با سرعت ۷۴۰۰ دور در دقیقه و زمان ۱۰ دقیقه حلال و چربی موجود در آن از آرد جدا شد و رسوب ته فالدکون که آرد چربی گیری شده بود جدا و در آون تحت خلا در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت یک ساعت خشک گردید [۸].

بعد از چربی زدایی آرد با هگزان نرمال، آن را به تسبتهای مختلف ۵، ۱۰ و ۱۵ برابر با آب مخلوط و توسط هیدروکسید سدیم ۰/۱ نرمال به pH های ۸، ۱۰ و ۱۲ رسانده شد و مخلوط فوق بر روی شیکر مغناطیسی به مدت ۱ ساعت مخلوط گشت. سپس مخلوط توسط سانتریفوژ با سرعت ۷۴۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شده و بخش محلول برای استفاده در مرحله بعد نگهداری شد. محلول بدست آمده از مرحله قبل توسط اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال به نقطه

1. World Health Organization (WHO)

2. Food and Agriculture Organization (FAO)

و ۱۰ دقیقه ($A_0 - A_1$) و مدت زمان (۱۰ دقیقه) بود [۸ و ۹].

۲-۳-۴- ظرفیت جذب چربی

ظرفیت جذب چربی نیز مطابق روش استاندارد AOAC (۲۰۰۰) و اسدیپور و همکاران (۱۳۸۹) با کمی تغییرات اندازه گیری گردید. به طوری که یک گرم نمونه پروتئین با ۱۰ میلی لیتر روغن آفتابگردان را در یک لوله سانتریفوژ از قبل وزن شده به مدت ۱۰ دقیقه مخلوط شد.

پس از سانتریفوژ کردن در ۵۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه بخش مایع فوقانی دور ریخته شد و لوله ها به مدت چند دقیقه روی کاغذ صافی واژگون نگه داشته شدند. لوله مجدداً توزین گردید. ظرفیت جذب چربی مطابق معادله زیر محاسبه شد [۱۱].

$$OAC = \frac{(W_r + W_p) - (W_s + W_p)}{W_s}$$

OAC : ظرفیت جذب روغن

W_r : وزن رسوب

W_p : وزن لوله سانتریفوژ

W_s : وزن نمونه

۲-۳-۵- ظرفیت جذب آب

ظرفیت جذب یا نگهداری آب طبق روش استاندارد AACC (۱۹۸۶) و رواقی و همکاران (۱۳۸۹) با اندکی تغییرات اندازه گیری گردید. به طوری که یک گرم نمونه در یک لوله سانتریفوژ از پیش توزین شده ریخته شد سپس ۲۰ میلی لیتر آب مقطر به آن افزوده شد و به مدت ۱۰ دقیقه بی وقفه هم زده شد. سپس مخلوط حاصل در ۵۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه سانتریفوژ شد. مایع رویی حاصل از سانتریفوژ دور ریخته شد و لوله ها به مدت چند دقیقه روی کاغذ صافی برای اطمینان از تخلیه کامل آب واژگون نگه داشته شدند. پس از توزین مجدد لوله میزان ظرفیت نگه داری آب مطابق رابطه زیر محاسبه شد [۱۵ و ۱۱].

$$WHC = \frac{(W_r + W_p) - (W_s + W_p)}{W_s}$$

WHC : ظرفیت نگهداری آب

W_r : وزن رسوب

W_p : وزن لوله سانتریفوژ

W_s : وزن نمونه

ایزوالکتریک پروتئین های لوبیا قرمز ($pH \ 4$) رسانده شد. مجدداً مخلوط در ۷۴۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد تا پروتئین رسوب نماید. رسوبات بدست آمده از این مرحله به منظور جداسازی ترکیبات باقیمانده احتمالی توسط آب مقطر چندین بار شستشو و مجدداً در ۷۴۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. رسوبات نهایی بدست آمده در آن ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۱ روز نگهداری شد تا ایزوله پروتئین نهایی بدست آید [۸ و ۹].

۲-۳-۲- آزمون های مورد مطالعه

۲-۳-۱- راندمان استخراج

راندمان استخراج پروتئین از طریق رابطه زیر بدست آمد [۱۰].

$$= \frac{\text{مقدار پروتئین تولید شده}}{\text{مقدار آید قبل از چربی گیری}} \times 100 = \text{راندمان استخراج (\%)}$$

۲-۳-۲- تعیین خلوص

اندازه گیری خلوص پروتئین بر اساس روش استاندارد کلدال انجام گرفت [۱۱].

۲-۳-۳- خاصیت امولسی فایری

جهت تعیین خاصیت امولسیون کنندگی میزان ۱/۵ میلی لیتر از روغن ذرت به ۴/۵ میلی لیتر از محلول پروتئین ۰/۵ درصد وزنی - حجمی در بافر فسفات ۰/۱ مولار ($pH = 7$) اضافه شد. سپس مخلوط در ۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای اتاق برای مدت زمان ۱ دقیقه باهمگن ساز یکنواخت شد. ۲/۵ میلی لیتر از امولسیون جدا شده از قسمت زیرین در زمان های مختلف و با ۵۰ میلی لیتر از محلول سولفات سدیم ۰/۱ درصد رقیق گردید. سپس میزان رقت امولسیون تشکیل شده در طول موج ثابت ۵۰۰ نانومتر و بوسیله طیف سنج نوری UV-Visible تعیین گردید. سپس شاخص امولسیون کنندگیو شاخص پایداری امولسیون کنندها استفاده از روابط زیر محاسبه شد [۱۲].

$$EAI (m^2 / g) = \frac{2 \times 2.303 \times A_0 \times N}{c \times \phi \times 10^4}$$

$$ESI (min) = \frac{A_0}{\Delta A} \times t$$

در این روابط A_0 میزان جذب محلول امولسیون شده بعد از همگن کردن، N فاکتور رقیق سازی (۱۵۰)، c وزن حجمی پروتئین افزوده شده به محلول (گرم بر میلی لیتر)، ϕ حجم فراکسیون روغن در امولسیون، ΔA اختلاف جذب بین زمان ۰

۲-۳-۶-رنگ سنجی

به منظور اندازه گیری تغییر رنگ کلی در نمونه های پروتئین از دستگاه هانتز لب مدل ۹۰۰-۰۲۵ ساخت آلمان که دارای شاخصهای L^* ، a^* و b^* است استفاده شد [۱۶]. در این دستگاه از سیستم سه محوری برای بیان رنگ استفاده می شود: محور L که شامل دو رنگ مکمل سیاه و سفید و رنگ خاکستری در بین آنها می باشد. در بالای این محور رنگ سفید خالص با نمبر ۱۰۰ و در پایین رنگ سیاه خالص با نمبر صفر نشان داده شده است.

محور a که در انتهای سمت راست آن رنگ قرمز خالص با نمبر ۶۰+ و در انتهای سمت چپ آن رنگ سبز با نمبر ۶۰- قرار دارد.

محور b که شامل رنگ های مکمل زرد و آبی بوده و رنگ زرد با نمبر ۶۰+ و رنگ آبی با نمبر ۶۰- در دو انتهای آن نشان داده می شود.

سپس به منظور بدست آوردن میزان تغییر رنگ کلی نسبت به کاشی سفید، از طریق شاخص L ، a و b توسط فرمول زیر محاسبه گشت [۱۶].

$$\Delta E = \sqrt{[L^* - L]^2 + (a^* - a)^2 + (b^* - b)^2}$$

۲-۴- طرح آماری

۲-۴-۱- رویه سطح پاسخ

رویه سطح پاسخ یا اختصاراً RSM^۳ مجموعه ای از روش های ریاضی است که رابطه بین یک یا چند متغیر پاسخ را با چندین متغیر مستقل (مورد مطالعه) تعیین می کند (ویتک - کروویاک و همکاران ۲۰۱۴). این روش در سال ۱۹۵۱ توسط باکس و ویلسون معرفی شد، تا به امروز نیز از آن به عنوان یکی از ابزارهای طراحی آزمایش استفاده می گردد. هر چند بسیاری این روش را به عنوان یک شبه مدل

(Metamodel) می دانند [۱۷].

روش سطح پاسخ، یکی از رویکردهای بررسی در طراحی آزمایش و علوم وابسته است. در روش سطح پاسخ سعی می شود تا با استفاده از یک طرح آزمایش مناسب، راهی برای تخمین برهم کنش ها، اثرات درجه دوم و حتی شکل موضعی

سطح پاسخ مورد مطالعه یافته شود. در این میان اهداف خاصی به طور جدی دنبال می شوند که از مهمترین شان می توان به بهبود فرایند با یافتن ورودی های بهینه، رفع مشکلات و نقاط ضعف فرایند و پایدارسازی آن اشاره کرد. در اینجا پایدارسازی مفهوم مهمی در آمار کیفیت است که به حداقل کردن اثرات متغیرهای ثانویه یا غیر کنترلی (اغتشاشی) دلالت می کند. متداول تر است که قبل از انجام مراحل روش سطح پاسخ، فرایند مورد مطالعه به خوبی بررسی شود و در ابتدا از یک طرح آزمایش غربال برای شناسایی اثر ورودی ها بر فرایند مورد مطالعه استفاده گردد [۱۸ و ۱۷].

یک روش آسان برای تخمین زدن مدل های چند جمله ای درجه اول استفاده از آزمون فاکتوریل یا آزمون فاکتوریل جزء به جزء است. این روش برای تعیین متغیری که اثر بیشتری بر روی متغیرهای پاسخ دارد کفایت می کند. اگر متغیر تشریحی دیگری معنی دار شده باشد می توان از طرح های پیچیده تر مثل طرح مرکب مرکزی استفاده کرد تا مدل چند جمله ای درجه دومی را ارزیابی کند که بهترین نزدیکی را به رفتار فرایند داشته باشد. به هر حال مدل درجه دوم به منظور بهینه سازی (حداکثر کردن، حداقل کردن و یا رسیدن به هدف خاص) پاسخ بکار می رود.

برای انجام طرح آماری و آنالیز نتایج حاصل از آزمون از نرم افزار Design Expert ورژن 7.0.0 استفاده شد. همانطور که اشاره شد در بررسی همزمان بیش از یک متغیر بروی متغیر پاسخ بهتر است از طرح مرکب مرکزی استفاده شود. لذا در این پژوهش بدلیل استفاده توأم از متغیرهای مختلف این طرح به عنوان طرح پیشنهادی مورد استفاده قرار گرفت.

در مرحله نخست تعداد سطوح تیمارها، با استفاده از بررسی منابع و عوامل موثر در فرایند انتخاب شد [۱، ۵ و ۷]. سپس دامنه این متغیرها تعیین شده و به صورت کران بالا و پایین در نرم افزار وارد می شوند. در این مطالعه از طراحی سطح پاسخ سه سطحی استفاده می شود. اثر همزمان متغیرهای مستقل شامل نسبت آب به آرد X_1 ، pH در فاز استخراج قلیایی X_2 تعیین شد.

۳- نتایج

۳-۱- راندمان استخراج

با توجه به جدول آنالیز واریانس داده های حاصل از آزمون راندمان استخراج پروتئین لوبیا قرمز (جدول ۱) و نیز شکل (۱)، مشاهده شد که عبارت خطی افزایش نسبت آب به آرد و pH قلیایی، همچنین عبارت درجه دوم نسبت آب به آرد، تاثیر معنی داری ($P < 0.05$) بر روی افزایش راندمان استخراج داشت. عبارت اثر متقابل نسبت آب به آرد و pH در مرحله قلیایی نیز معنی دار ($P < 0.05$) بود و سبب یک تاثیر آنتاگونیستی بر روی راندمان استخراج شد و با افزایش هر دو متغیر مستقل راندمان استخراج کاهش یافت.

در pH های بالا و پایین تر از نقطه ایزوالکتریک راندمان

استخراج و حلالیت پروتئین به دلیل دافعه یون های مثبت و منفی و همچنین افزایش بر هم کنش زنجیره های پلی پپتیدی باردار با مولکول های دو قطبی آب افزایش می یابد [۳۳].

نتایج بدست آمده با اکثر مقالات مطابقت داشت به طوری که با افزایش pH راندمان استخراج پروتئین افزایش یافت [۲۱-۱۹]. برخی محققین اختلاف در حلالیت آرد حبوبات مختلف را به دلیل اختلاف در ترکیب فیزیکوشیمیایی آنها بیان کردند. از دلایل دیگر اختلاف می توان به میزان توازن بین نسبت آبدوستی و آگریزی اشاره نمود که به ترکیب اسیدهای آمینه خصوصاً در سطح پروتئین بستگی دارد [۱۹]. احتمالاً با افزایش نسبت آب به آرد طیف وسیع تری از پروتئین ها استخراج و در نتیجه راندمان استخراج در فاز قلیایی بیشتر گردیده است.

Table 1 ANOVA response surface quadratic model for yield

source	Som of Squares	df	Mean square	F value	P-Value
model	29.58	5	5.92	30.91	0.0001s
A-Water Ratio	6.41	1	6.41	33.47	0.0007**
B-Alkaline Ph	3.23	1	3.23	16.86	0.0045**
AB	11.56	1	11.56	60.40	0.0001**
A ²	6.89	1	6.89	35.99	0.0005**
B ²	0.017	1	0.017	0.091	0.7720**
Residual	1.34	7	0.19		
Lack of Fit	0.66	3	0.22	1.29	0.3913 ns
Pure Error	0.68	4	0.17		
Cor total	30.92	12			

($P < 0.05$) بر روی افزایش خلوص داشت. بر اساس شکل (۲) با افزایش pH از ۸ تا ۱۰ خلوص ایزوله پروتئین کاهش یافت که این امر به دلیل خروج بیشتر مواد غیر پروتئینی در pH های بالا می باشد [۲۲].

Design-Expert® Software

Purity (%)
88
62

X1 = A: water Ratio
X2 = B: Alkaline pH

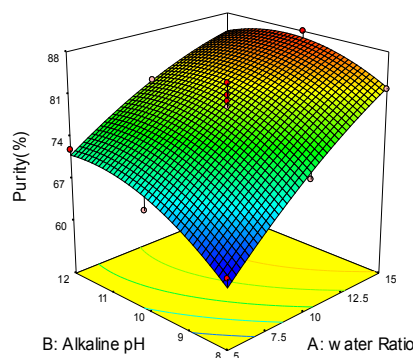


Fig 2 Effect of alkaline pH and water ratio on purity

Design-Expert® Software

Yield (%)
13.7
8

X1 = A: water Ratio
X2 = B: Alkaline pH

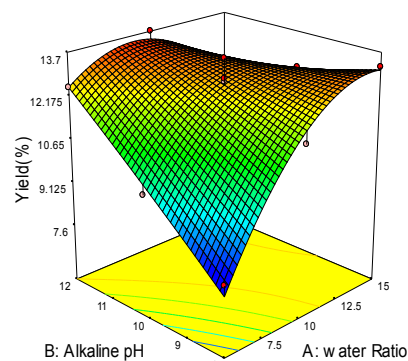


Fig 1 Effect of alkaline pH and water ratio on yield

۳-۲- تعیین خلوص

با توجه به جدول آنالیز واریانس داده های حاصل از آزمون خلوص پروتئین لوبیا قرمز (جدول ۲) و نیز شکل (۲)، مشاهده شد که عبارت خطی افزایش نسبت آب به آرد و pH قلیایی، همچنین عبارت درجه دوم pH قلیایی، دارای تاثیر معنی داری

افزایش ارتباط یا انجام واکنش این اجزاء با یکدیگر شود. در چنین حالتی ممکن است به برخی از ویژگی های پروتئین از جمله حلالیت آن آسیب وارد گردد [۲۳].

کاهش خلوص پروتئین در نسبت های پایین تر آب به آرد احتمالاً به این دلیل است که کاهش آب در یک سیستم غذایی که با تغلیظ و تمرکز اجزای غذایی همراه است، می تواند سبب

Table 2 ANOVA response surface quadratic model for purity

source	Som of Squares	df	Mean square	F value	P-Value
model	608.62	5	121.72	27.33	0<0.0002**
A-Water Ratio	468.17	1	468.17	105.12	0.0001**
B-Alkaline Ph	64.68	1	64.68	14.25	0.0066**
AB	16.00	1	16.00	3.59	0.0999 ns
A ²	8.01	1	8.01	1.80	0.02217 ns
B ²	31.06	1	31.06	6.97	0.0334*
Residual	31.17	7	4.45		
Lack of Fit	11.17	3	3.72	0.74	0.5789 ns
Pure Error	20.00	4	5.00		
Cor total	639.79	12			

pH های قلیایی شدید، از میزان خصوصیات امولسیون

کنندگی پروتئین کاسته شده است.

۳-۳- خاصیت امولسیون کنندگی

با توجه به جدول آنالیز واریانس داده های حاصل از آزمون خاصیت امولسی فایری پروتئین لوبیا قرمز (جدول ۳) و نیز شکل (۳)، مشاهده شد که عبارت خطی افزایش نسبت آب به آرد و pH قلیایی، دارای تاثیر معنی داری ($P < 0.05$) برافزایش خاصیت امولسی فایری داشت. عبارت اثر متقابل نسبت آب به آرد و pH در مرحله قلیایی نیز معنی دار ($P < 0.05$) بود و سبب یک تاثیر آنتاگونیستی بر روی خاصیت امولسی فایری داشت و با افزایش هر دو متغیر مستقل خاصیت امولسی فایری کاهش یافت.

pH مورد استفاده جهت استخراج پروتئین و شرایط خشک کردن آن نقش مهمی در خصوصیات امولسی فایری پروتئین های حبوبات ایفا می کنند، لذا در تحقیقات محققین گذشته نتایج بسیار متنوعی برای دامنه ی فعالیت امولسی فایری پروتئین های مختلف گزارش شده است. احتمالاً به دلیل کاهش خلوص و کیفیت پروتئین استحصالی در

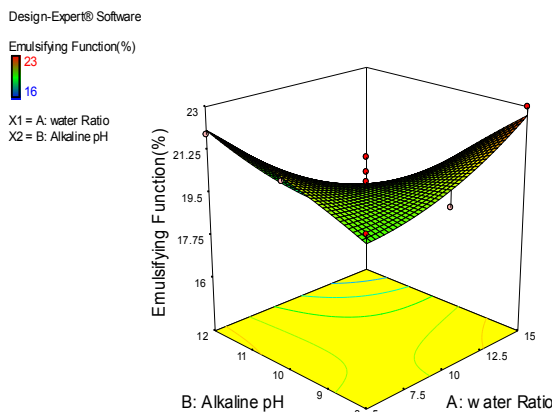


Fig 3 Effect of alkaline pH and water ratio on emulsifying function

به عبارتی خصوصیات عملگرایی پروتئین از قبیل خصوصیت امولسیون کنندگی تابع خلوص آن نیز می باشد و با کاهش خلوص پروتئین از میزان امولسیون کنندگی آن کاسته می شود [۲۴ و ۲۵].

Table 3 ANOVA response surface quadratic model for emulsifying function

source	Som of Squares	df	Mean square	F value	P-Value
model	30.29	5	6.06	12.65	0.0021**
A-Water Ratio	3.84	1	3.84	8.02	0.0253*
B-Alkaline Ph	7.15	1	7.15	14.93	0.0062**
AB	18.49	1	18.49	38.62	0.0004**
A ²	0.08	1	0.80	1.68	0.2360 ns
B ²	0.15	1	0.15	0.32	0.5896 ns
Residual	3.35	7	0.48		
Lack of Fit	0.94	3	0.31	0.52	0.6896 ns
Pure Error	2.41	4	0.60		
Cor total	33.64	12			

۳-۴- ظرفیت جذب چربی

با توجه به جدول آنالیز واریانس داده های حاصل از آزمون جذب چربی پروتئین لوبیا قرمز (جدول ۴) و نیز شکل (۴)، مشاهده شد که عبارت خطی افزایش نسبت آب به آرد و pH قلیایی، دارای تاثیر معنی داری ($P < 0.05$) بر روی افزایش جذب چربی داشت. عبارت اثر متقابل نسبت آب به آرد و pH در مرحله قلیایی نیز معنی دار ($P < 0.05$) بود و سبب یک تاثیر سینرژیستی بر روی جذب چربی داشت و با افزایش هر دو متغیر مستقل جذب چربی کاهش یافت.

مکانیسم جذب روغن شامل اتصالات فیزیکی روغن با اجزاء پروتئین و میل ترکیبی زنجیره پروتئین های غیر قطبی برای اتصال با چربی می باشد [۲۶].

علت بالاتر بودن ظرفیت جذب چربی ایزوله حاصل از pH های قلیایی احتمالاً ناشی از خروج بیشتر چربی و تغییرات ناشی از دناتوراسیون در pH های بالا بود [۱۵].

محققین دیگری گزارش کرد که قابلیت جذب روغن توسط کنستاتره پنبه دانه کمتر تحت تاثیر pH قرار می گیرد این میزان برای جذب روغن ۱/۵ گرم در دو گرم کنستاتره است [۲۷].

همچنین برخی دیگر از محققین که به بررسی خواص عملکردی عصاره ی پروتئینی جو دو سر پرداخته بودند بیان

داشتند که ظرفیت جذب چربی با افزایش هیدرولیز pH کاهش می یابد [۲۸].

بسیاری از پژوهشگران میزان جذب روغن را به عنوان محبوس کردن فیزیکی روغن عنوان نموده اند و آن را به زنجیره های غیر قطبی پروتئین که ممکن است با زنجیره های جانبی هیدروکربن روغن پیوند برقرار کنند و همچنین به شکل فضایی پروتئین نسبت می دهند و در نتیجه اختلاف بین این عوامل را در مواد غذایی مختلف نظیر حبوبات باعث اختلاف در اعداد بدست آمده در جذب روغن پیشنهاد می کنند [۲۸].

همچنین پژوهشگران دیگری نیز نشان دادند که هر چه اسیدهای آمینه غیر قطبی در زنجیره های جانبی پروتئین بیشتر باشند ظرفیت جذب روغن بیشتر است [۲۹].

در بین حبوبات عدس، لوبیا قرمز، نخود و لوبیا چیتی حداکثر میزان جذب روغن در لوبیای قرمز بدست آمده اند به علت افزایش اسیدهای آمینه های غیر قطبی در زنجیره جانبی می باشد و از آن می توان در محصولاتی مانند دسر ها و سس مایونز که مقدار روغن مصرفی بالاست استفاده کرد [۳۰].

احتمالاً با افزایش میزان آب به آرد و نیز pH قلیایی بخشی از کربوهیدرات موجود در لوبیا نیز وارد بخش ایزوله استحصال شده و به دلیل توانایی زیاد کربوهیدرات در باند شدن با چربی، میزان جذب چربی با افزایش همزمان نسبت آرد به آب و pH قلیایی افزایش یافته است.

Table 4 ANOVA response surface quadratic model for fat absorption

P-Value	F value	Mean square	df	Som of Squares	source
0.0001**	50.00	0.71	5	3.56	model
0.0001**	156.10	2.22	1	2.22	A-Water Ratio
0.0001**	70.33	1.00	1	1.00	B-Alkaline Ph
0.0019**	23.24	0.33	1	0.33	AB
0.7587 ns	0.10	0.001452	1	0.001452	A ²
0.7587 ns	0.10	0.001452	1	0.001452	B ²
		0.014	7	0.100	Residual
0.9500 ns	0.11	0.002524	3	0.007573	Lack of Fit
		0.023	4	0.092	Pure Error
			12	3.66	Cor total

ns, *, **, به ترتیب غیر معنی دار و معنی دار در سطح $\alpha=0.01$ و $\alpha=0.05$

Std. Dev.	0.12	R-Squared	0.9728
Mean	1.05	Adj R-Squared	0.9533
C.V. %	11.31	Pred R-Squared	0.9436
PRESS	0.21	Adeq Precision	25.095

سینرژیستی بر روی جذب آب داشت و با افزایش هر دو متغیر مستقل خاصیت جذب آب افزایش بیشتری یافت.

پدیده اخیر نشان دهنده ی این امر بود که دنا تراسیون ایجاد شده در روش قلیایی و خروج بیشتر چربی نسبت به روش اسیدی به افزایش ظرفیت جذب آب کمک کرده است [۱۵].

همچنین ممکن است یکی دیگر از دلایل بالاتر بودن ظرفیت جذب آب این ایزوله به بیشتر بودن ناخالصی آن برگردد. pH محیط به خاطر تغییراتی که در میزان گروه های باردار موجود در سطح پروتئین به وجود می آورد می تواند به شکل مؤثری بر ویژگی های جذب آب پروتئین ها تأثیر گذارد [۲۳].

حضور چربی از تعداد مگان های موثر برای باند کردن مواد هیدروفیل کاسته و باعث کاهش ظرفیت جذب آب می شود [۳۱].

برخی پژوهشگران دیگر نشان دادند بیان داشتند که ظرفیت جذب و نگهداری آب با افزایش درجه هیدرولیز pH افزایش می یابد [۳۱]. هرچه میزان چربی آرد بالاتر باشد ظرفیت جذب آب کاهش می یابد و این برای نخود که میزان چربی محتوی ۵/۱۶ درصد دارد ظرفیت جذب آب پایینی دارد [۳۲].

Design-Expert® Software

Fat Absorption (ml/g)

2.36

0.39

X1 = A: water Ratio

X2 = B: Alkaline pH

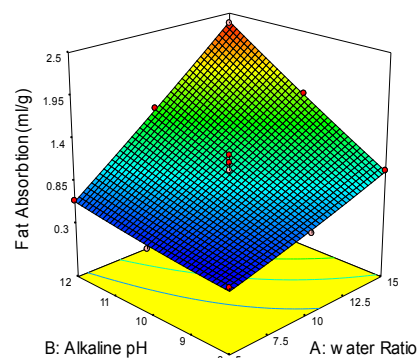


Fig 4 Effect of alkaline pH and water ratio on fat absorption

۳-۵- ظرفیت جذب آب

با توجه به جدول آنالیز واریانس داده های حاصل از آزمون جذب آب پروتئین لوبیا قرمز (جدول ۵) و نیز شکل (۵)، مشاهده شد که عبارت خطی افزایش نسبت آب به آرد و pH قلیایی، همچنین عبارت درجه دوم نسبت آب به آرد، دارای تاثیر معنی داری ($P < 0.05$) بر روی افزایش جذب آب داشت. عبارت اثر متقابل نسبت آب به آرد و pH در مرحله قلیایی نیز معنی دار ($P < 0.05$) بود و سبب یک تاثیر

Table 5 ANOVA response surface quadratic model for water absorption

P-Value	F value	Mean square	df	Som of Squares	source
0.0001**	34.18	0.72	5	3.60	model
0.0001*	140.81	2.97	1	2.97	A-Water Ratio
0.0010**	28.85	0.61	1	0.61	B-Alkaline Ph
0.4003 ns	0.80	0.017	1	0.017	AB
0.7104 ns	0.15	0.003154	1	0.003154	A ²
0.7514 ns	0.11	0.002920	1	0.002920	B ²
		0.021	7	0.15	Residual
0.9199 ns	0.16	0.005182	3	0.016	Lack of Fit
		0.033	4	0.13	Pure Error
			12	3.75	Cor total

ns, *, **, به ترتیب غیر معنی دار و معنی دار در سطح $\alpha=0.01$ و $\alpha=0.05$

Std. Dev.	0.15	R-Squared	0.9606
Mean	2.44	Adj R-Squared	0.9325
C.V. %	5.95	Pred R-Squared	0.9094
PRESS	0.34	Adeq Precision	20.717

۳-۶-رنگ سنجی

با توجه به جدول آنالیز واریانس داده های حاصل از آزمون رنگ سنجی پروتئین لوبیا قرمز (جدول ۶) و نیز شکل (۱)، مشاهده شد که عبارت خطی افزایش نسبت آب به آرد و pH قلیایی، همچنین عبارت درجه دوم نسبت آب به آرد، دارای تاثیر معنی داری ($P < 0.05$) بر روی افزایش راندمان استخراج داشت.

با بالا رفتن pH به دلایل گوناگون از جمله خروج رنگ دانه ها از آرد در pHهای بالا ایزوله های تیره تری بدست آمد. رنگ کنسانتره پروتئین پنبه دانه به pH بستگی دارد به طوری که در دامنه ی pH اسیدی رنگ آن سفید و در pH قلیایی زرد می شود [۳۳ و ۲۲ و ۱۰]. از سوی دیگر به هنگام خشک شدن پروتئین این رنگدانه ها رنگ تیره تری را در پروتئین ایجاد نمودند. این رنگدانه ها که بیشتر منشا آنها پوست لوبیا بود سبب ایجاد رنگ تیره تری در قیاس با نمونه های پروتئین با خلوص بالاتر گردید.

اگرچه استخراج ایزوله باعث افزایش خصوصیات تغذیه می شود اما خصوصیت رنگی را بهبود نمی بخشد [۳۴].

Design-Expert® Software

Water Absorption (ml/g)

3.48

1.44

X1 = A: water Ratio

X2 = B: Alkaline pH

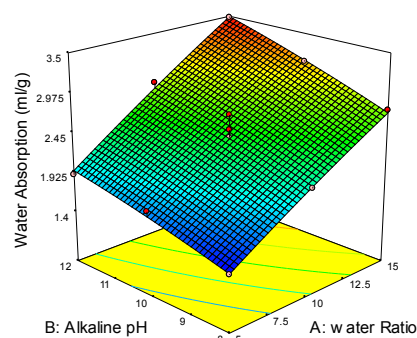


Fig 5 Effect of alkaline pH and water ratio on water absorption

همانطور که در بخش قبل اشاره شد با افزایش میزان استخراج پروتئین از خلوص آن کاسته شده و بخشی از کربوهیدرات های موجود در لوبیا وارد ایزوله گردید؛ لذا با افزایش میزان پروتئین بدست آمده که حاوی کربوهیدرات و بخشی از فیبر بود میزان جذب آب نیز در پروتئین افزایش یافته است. این پدیده احتمالا بدلیل باند شدن بهتر آب با کربوهیدرات های موجود در پروتئین بود.

Table 6 ANOVA response surface quadratic model for total color change

P-Value	F value	Mean square	df	Som of Squares	source
0.0028**	11.55	117.16	5	585.78	model
0.0105*	11.98	121.50	1	121.50	A-Water Ratio
0.0003**	42.74	433.50	1	433.50	B-Alkaline Ph
0.2005 ns	2.00	20.25	1	20.25	AB
0.5885 ns	0.32	3.26	1	3.26	A ²
0.5885ns	0.32	3.26	1	3.26	B ²
		10.14	7	70.99	Residual
0.7493ns	0.42	5.66	3	16.99	Lack of Fit
		13.50	4	54.00	Pure Error
			12	656.77	Cor total

ns, *, **, به ترتیب غیر معنی دار و معنی دار در سطح $\alpha=0.05$ و $\alpha=0.01$

Std. Dev.	3.18	R-Squared	0.8919
Mean	47.69	Adj R-Squared	0.8147
C.V. %	6.68	Pred R-Squared	0.6344
PRESS	240.09	Adeq Precision	12.018

۳-۷- بهینه سازی

پس از آنالیز واریانس داده ها به منظور بهینه سازی عددی به منظور یافتن یک فرایند بهینه بر اساس تمامی آزمونهای فیزیکی شیمیایی، متغیرهای مستقل بهینه شد. یک پروتئین مطلوب دارای کمترین میزان تغییر رنگ کلی و بیشترین میزان راندمان، خلوص، جذب آب، جذب چربی و خصوصیات امولسیون کنندگی است. لذا با در نظر گرفتن این موارد به یافتن نقطه بهینه پرداختیم که با توجه به جدول (۷) نقاط بهینه، در شرایطی که از نسبت ۱۵ برابر آب به آرد و pH ۸/۸ در مرحله استخراج قلبایی استفاده شود راندمان استخراج برابر با ۱۲/۷۶ درصد، میزان خلوص ۸۴/۹۵ درصد، جذب چربی ۱/۲۵ درصد، جذب آب ۲/۹ درصد و تغییر رنگ کلی ۴۶/۲۶ است.

Design-Expert® Software

Total Color Change

63

37

X1 = A: water Ratio

X2 = B: Alkaline pH

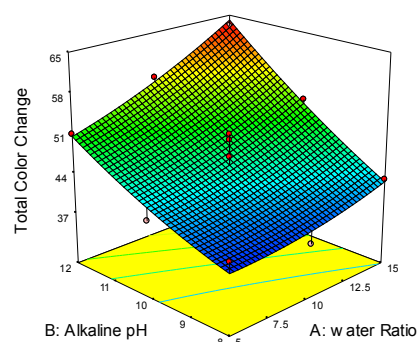


Fig 6 Effect of alkaline pH and water ratio on total color change

Table 7 physicochemical property prediction of optimized process of kidney bean protein extraction

Desirability	Total Color Change	Water Absorption(%)	Fat Absorption(%)	Emulsifying Function(%)	Purity(%)	Yield(%)	Alkaline Ph	Water Ratio	Number
0.700	46.2633	2.90088	1.25875	21.5026	84.951	12.7667	8.80981	15	1
0.700	46.1125	2.8942	1.24807	21.5499	84.8659	12.7806	8.77788	14.9999	2
0.700	46.0438	2.89115	1.2432	21.5714	84.8265	12.787	8.76325	15	3
0.700	45.9323	2.88617	1.23528	21.6064	84.7615	84.7615	8.73953	15	4

۴- نتیجه گیری

با استفاده از روش تک مرحله ای استخراج در pH قلبایی مناسب، می توان از لوبیای قرمز پروتئینی تولید نمود که دارای خصوصیات مناسب فیزیکی شیمیایی باشد. نتایج نشان دهنده تاثیر مثبت افزایش میزان آب در برابر آرد و استفاده از pH قلبایی ملایم بر خصوصیات فیزیکی شیمیایی ایزوله پروتئینی استخراج شده از لوبیای قرمز بود. بهترین استخراج پروتئین زمانی ایجاد شد که از نسبت آب به آرد ۱۵ برابری و pH برابر با ۸/۸ استفاده گشت. زیرا این فرمول دارای بیشترین راندمان، خلوص، خصوصیات امولسیون کنندگی، جذب چربی و آب و کمترین تغییر رنگ کلی بود.

همانطور که در شکل ۷ مشاهده شد با افزایش میزان آب به آرد و میزان pH در نمونه ها میزان مطلوبیت افزایش یافته است اما این روند ثابت نیست و در نسبت های بالا آب به آرد بالا بودن میزان pH سبب کاهش مطلوبیت شده است. این پدیده احتمالا بدلیل تاثیر pH قلبایی شدید بر محلول کردن سایر اجزای غیر پروتئینی و کاهش کیفیت پروتئین محصول بود. بنابراین توصیه می شود از غلظتهای قلبایی ملایم تری به منظور استخراج پروتئین در این مرحله استفاده شود.

Design-Expert® Software

Desirability

1

0

X1 = A: water Ratio

X2 = B: Alkaline pH

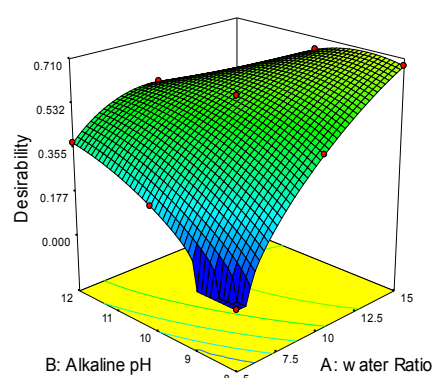


Fig 7 Effect of alkaline pH and water ratio on desirability

۵- منابع

- [1] Zhang, B. Y., Yuan, Y. L., Gao, Y. J., Su, X. Y., & Ren, H. W. (2010). Study on nutritional assessment and functional properties of kidney bean protein. Science and Technology of Food Industry, 31(11), 347e350.
- [2] United States Department of Agriculture Agricultural Research Service, (2017).

- point, Journal of innovation in food science and technology, 4. (In Persian).
- [14] Paraman, I., Hettiarachchy, N. S., Schaefer, C., & Beck, M. I., (2007). Hydrophobicity, solubility, and emulsifying properties of enzyme-modified rice endosperm protein. *Cereal Chemistry*, 84(4), 343–349.
- [15] Ravaghi, M., Tehrani, M., Asoodeh, A. (1389). Evaluate the functional properties of four types of soybean production in Iran, *Journal of Iranian food science*, 6(3), (in Persian).
- [16] Taqi, A., Askar, K. A., Khaled, N., Lucia, M., and Ioan Stamatin., (2011). Effect of different concentrations of olive oil and oleic acid on the mechanical properties of albumen (egg white) edible films., *African Journal of Biotechnology* Vol. 10(60), pp. 12963-12972, 5 October.
- [17] Fu, M. C. Handbook of simulation optimization. (2015). Vol. 216. New York: Springer.
- [18] Soltani, M. and Soltani, J., (2016). Determination of optimal combination of applied water and nitrogen for potato yield using response surface methodology (RSM). *Journal of Bioscience Biotechnology Research Communication* 9(1): 46-54. Online Contents Available at: <http://www.bbric.in>
- [19] Adebawale, K. O. and O. S. Lawal. (2004). Comparative study of the functional properties of bambarra groundnut (*Voandzeia subterranean*), jack bean (*Canavalia ensiformis*) and mucuna bean (*Mucuna pruriens*) flours." *Food Research International* 37(4): 355-365.
- [20] Adebawale, Y. A., I. A. Adeyemi (2005). Functional and physicochemical properties of flours of six *Mucuna* species." *African Journal of Biotechnology* 4(12): 1461-1468
- [21] Chau, C. F. and P. C. K. Cheung., (1998). Functional properties of flours prepared from three Chinese indigenous legume seeds. *Food Chemistry* 61(4): 429-433.
- [22] Farhoosh, R. (1374). Investigate the possibility producing soy protein isolat, M.Sc. Thesis, Tarbiat Modarres University of Tehran (in Persian).
- [23] Fatemi, H. (1378). *Food Chemistry*. Tehran, Enteshar publication (in Persian).
- [24] Fuhrmeister, H., & Meuser, F., (2003). Impact of processing on functional properties of protein products from wrinkled peas. National Nutrient Database for Standard. Reference Release 28.
- [3] Vadivel, V. and K. Janardhanan., (2001). Nutritional and anti-nutritional attributes of the under-utilized legume, *Cassia floribunda* Cav. *Food Chemistry* 73: 209-215.
- [4] Mune M, Alain, M., Rene S., Minka, (2008). Response surface methodology for optimisation of protein concentrate preparation from cowpea (*Vigna unguiculata* L.) Walp), *Food Chemistry* 110 735–741.
- [5] Tiezheng Ma, Qiang Wang, Haiwen Wu., (2010). Optimization of extraction conditions for improving solubility of peanut protein concentrates by response surface methodology, *Food Science and Technology* 43, 1450-1455.
- [6] Wang H, Johnson LA and Wang. (2004). Preparation of soy protein concentrate and isolate from extruded-expelled soybean meals. *Journal of American Oil Chemists' Society* 81: 713-717.
- [7] Horax, R., Navam, H., Kannan, A., Chen, P., (2011). Protein extraction optimisation, characterisation, and functionalities of protein isolate from bitter melon (*Momordica charantia*) seed, *Food Chemistry* 124, 545-550.
- [8] Horax, R., Hettiarachchy, N. S., Chen, P., & Jalaluddin, M., (2004). Preparation and characterization of protein isolate from cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *Journal of Food Science*, 69, FCT114–FCT118.
- [9] Ju, Z. Y., Hettiarachchy, N. S., & Rath, N., (2001). Extraction, denaturation, and hydrophobic properties of rice flour proteins. *Journal of Food Science*, 66, 229–232.
- [10] Sadeghian, L. (1389). Optimization of Pea protein isolate production using response surface methodology. , MsC. Thesis., Sabzevar Islamic Azad University (in Persian).
- [11] AACC, (1983). Approved Method of Am. Assn. of Cereal Chemistry.
- [12] Agboola S., Ng D., & Mills, D. (2005). Characterization and functional properties of Australia rice protein isolates. *Journal of Cereal Science*, 41, 283–290.
- [13] Meshkani, S. M., Poor Fallah, Z., Beheshti, R., Feizi, J. (1391). Functional properties of chickpea protein concentrate extracted using deposition technique in the isoelectric

- protein and oil and water absorption capacity of the of various cereals flour, Journal of Iranian food science, 6(3), (in Persian).
- [31] Heywood, A.A., Myers, D.J., Baiely, T.B. and Johnson, L.A. (2002). Functional properties of low fat soy flour produced by an extrusion-expelling system. Journal of American Oil Chemist' Society, 79(12), 1249-1253
- [32] Kaur, M. and N. Singh.,(2005). Studies on functional, thermal and pasting properties of flours from different chickpea (*Cicerarietinum L.*) cultivars. Food Chemistry 91(3): 403-411.
- [33] Najafi, M.A. (1378). Preparation of cottonseed meal protein concentrate for human consumption, MSc. Thesis, TarbiatModarres University of Tehran (in Persian).
- [34] Taskaya, Latif, Yi-Chen Chen, JacekJaczynski. , (2010). Color improvement by titanium dioxide and its effect on gelation and texture of proteins recovered from whole fish using isoelectric solubilization/precipitation, Food Science and Technology 43, 401-408.
- Journal of Food Engineering, 56(2-3), 119-129.
- [25] L'Hocine, L., Boye, J. I., & Arcand, Y., (2006). Composition and functional properties of soy protein isolates prepared using alternative defatting and extraction procedures. Journal of Food Science, 1(3), C137-145.
- [26] Kinsella, J.E., (1979). Functional properties of soy proteins. Journal of American oil society chemists 56: 242-258.
- [27] Spadaro, JJ., Gardner homer ,KJ ., (1979). Food uses for cotton seed protein , 422-424.
- [28] Guan, Xiao a, Huiyuan Yao. (2008). Optimization of Viscozyme L-assisted extraction of oat bran protein using response surface methodology, Food Chemistry 106, 345-351.
- [29] Abu, J. O., & K. Muller. (2005). Functional properties of cowpea (*Vigna unguiculata L. Walp*) flours and pastes as affected by gamma-irradiation. Food Chemistry 93: 103-111.
- [30] Asadpour, E., Jafari, S.M., Mahounak, A., Ghorbani. M. (1389). Evaluation of soluble

Kidney bean (*Phaselous vulgaris L.*) protein extraction process optimization by response surface methodology

Atay Salehi, E. ^{1*}, Khoori, E. ¹, Hosseinzadeh, A. ²

1. Department of Food Science and Technology, Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran

2. Department of Food Science and Technology, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran

(Received: 2017/08/13 Accepted: 2018/10/22)

The extraction of proteins from plant sources, in areas of the world where access to animal protein is limited, because of cost and availability is very important. Kidney beans are good sources of protein and contain a good profile of amino acids that can be used in this field. In this study the effect of different ratios of water to flour (5, 10 and 15 times) and different pH (8, 10 and 12) in alkaline extraction step on the physicochemical properties of the protein was investigated. The results showed significant effect ($P < 0.05$) independent variables on efficiency, Purity, emulsifying properties, water and fat absorption and also total color change of produced protein. Process optimization showed that the use of water to flour ratio of 15 times, and pH of 8.8 to produce the extraction of proteins from kidney beans with 12.76 percent efficiency, which contains a 84.95 percent purity, power emulsifying 21.5 percent, 2.9 percent fat absorption, water absorption 1.2% and 46.26 of overall color change in the 0.700 level of desirability.

Keyword: Kidney bean, Protein, Response surface methodology, physicochemical properties

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