ارزیابی تنوع فراکسیون‌های نیتروژنی و خصوصیات عملکردی ایزوله پروتئین نخود (*Cicer arietinum L.*)

فرناز بخشی مقدم[1]، سیدعلی مرتضوی[2]، الناز میلانی[3*]، مجیدهاشمی[4]

[1] دانش آموخته کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار، سبزوار، ایران

[2] استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

[3] استادیار گروه فرآوری مواد غذایی، پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی جهاد دانشگاهی مشهد، مشهد، ایران

[4] دانش آموخته کارشناسی علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: 1390/4/3 تاریخ پذیرش: 1390/7/3

چکیده

نخود (*Cicer arietinum L.*) جزء منابع مهم پروتئین‌های غذایی محسوب می‌شود. صرفه نظر از خصوصیات تغذیه‌ای، پروتئین‌های دانه نخود به عنوان عملگر نقش مهمی را در فرمولاسیون و فراوری مواد غذایی دارا هستند. در این تحقیق تأثیر pH استخراج پروتئین از دانه‌های نخود کابلی بر ویژگی‌های انحلال‌پذیری، خصوصیات امولسیون کنندگی، ظرفیت جذب آب و تنوع فراکسیون‌های نیتروژنی ایزوله تولیدی از دو روش استخراج اسیدی و قلیایی بررسی گردید. کلیه آزمون‌ها در سه تکرار انجام شد و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح اطمینان 95 درصد انجام پذیرفت. در این پژوهش استخراج پروتئین در pH 2/5 و 9/5 و به دنبال آن ترسیب در نقطه ایزوالکتریک معادل pH 4/5، انجام شد. انحلال پذیری ایزوله پروتئین نیز در محدوده pH 2/5 تا 7 بررسی گردید. نتایج حاصل از آنالیز واریانس نشان داد؛ pH محیط تأثیر معنی داری بر حلالیت پروتئین‌ها داشته است ($p\leq0.05$). پروفیل انحلال در برابر pH، دارای بالاترین حلالیت در pH 7 و پس از آن در pH 2/5 بود. کمترین حلالیت نیز در pHهای 4 و 5/5 مشاهده شد. هم‌چنین ایزوله تهیه شده به روش اسیدی (ایزوله A) نسبت به ایزوله تولید شده به روش قلیایی(ایزوله B) دارای حلالیت بالاتری بود. هر دو ایزوله خصوصیات امولسیونی و جذب آب خوب و مناسبی از خود نشان دادند. ایزوله حاصل از روش اسیدی دارای خصوصیات امولسیون کنندگی بالاتری بود در حالی که روش قلیایی باعث تقویت ظرفیت نگه داری آب ایزوله پروتئین شده بود ($p\leq0.05$). الکتروفورز(SDS-PAGE) نشان داد که گلوبولین نخود از اجزایی با وزن‌های مختلف مولکولی در محدوده 10تا150کیلودالتون تشکیل شده است. باندهای 30-40 کیلودالتون مربوط به اجزاء اسیدی 11S گلوبولین (لگومین) و باند 25 کیلو دالتون احتمالاً مربوط به جزء بازی لگومین بود. شدت و غلظت باندهای مشاهده شده در الکتروفورز مربوط به ایزوله قلیایی بیشتر بود؛ دلیل این امر ناشی از نزدیکی اندازه pH استخراج پروتئین ایزوله قلیایی به pH بهینه استخراج گلوبولین، بود. با توجه به خصوصیات عملکردی مناسب ایزوله‌های پروتئین نخود، می‌توان از این منبع مفید در فرآورده‌های غذایی به عنوان جایگزین پروتئین بهره برد.

واژه‌های کلیدی: ایزوله پروتئین، خصوصیات عملکردی، الکتروفورز، نخود.

* مسوول مکاتبه: e_milani81@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir

1- مقدمه

پروتئین یکی از مواد غذایی عمده در تغذیه جانداران بوده و از دو منبع گیاهی و حیوانی قابل تأمین است. در فرن حاضر، نظر به افزایش ناموزون جمعیت بشری و نیز رشد محدود منابع حیوانی که بالطبع عدم توازن نظام عرضه و تقاضا را در پی داشته است، بحث کمبود پروتئین بخصوص در جوامع در حال توسعه بیش از پیش شدت پیدا کرده است(6). نخود با نام علمی *Cicer arietinum L.)* گیاهی است یک ساله، سازگار با آب وهوای خشک و محل رویش آن عمدتا در شبه قاره هند و پهنه مدیترانه است؛ دو نوع اصلی نخود، کابلی و دسی هستند(3). مقدار پروتئین خام دانه نخود 17 تا 24% و حداکثر 12/4 تا 31/5% متغیر است. محیط رشد، شرایط مزرعه و عملیات زراعی از عوامل موثر در تغییر پروتئین دانه نخود، می‌باشد. این عوامل در کیفیت غذایی پروتئین موثر هستند(32). خصوصیات عملکردی پروتئین‌ها در وافع آن دسته از خصوصیات فیزیکو شیمیایی ذاتی پروتئین است که بر رفتار پروتئین در سیستم‌های فراوری، تولید، نگه داری و آماده سازی تأثیر گذار است و شامل حلالیت، کنترل ویسکوزیته، ژله ای شدن، ظرفیت اتصال آب، چربی، خاصیت امولسیفایری و تولید کف میباشد(18).پروتئین‌های اصلی دانه نخود گلوبولین‌ها و آلبومین‌ها می‌باشند که گلوبولین شامل دو جزء لگومین (11s) و ویسیلین (7s) بوده و نسبت لگومین به ویسیلین 6به1 است. توانایی پروتئین برای جذب آب، جهت حفظ رطوبت محصولات گوشتی چرخ شده و خصوصیات بافتی وطلوب محصولات نانوایی و محصولات ژل مانند مفید می‌باشد(15 و 26). موضوع جذب آب پروتئین‌ها، به دنبال خود، مقوله حلالیت آنها را مطرح می‌سازد. نظر به اینکه در بسیاری از سیستم‌های غذایی وجود پروتئین به صورت محلول در سیستم، مورد نظر و ضروری است، خصوصیت حل شدن پروتئین از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است(5). از طرف دیگر حلالیت پروتئین بر خصوصیاتی نظیر امولسیون کنندگی و کف کنندگی آنها مؤثر است(16و32). یکی از خصوصیات عمل کنندگی اساسی پروتئین های نخود توانایی آن ها در تشکیل امولسیون های پایدار در سیستم های غذایی متنوع شامل خامه، سس، سوپ های خامه ای، محصولات گوشتی مثل سوسیس است (17). کف های پروتئینی متشکل از حباب های گاز است که توسط یک فیلم مایع حاوی پروتئین های محلول با فعالیت سطحی، کپسوله شده است؛ این امر کشش سطحی بین گاز و آب را کاهش می‌دهد. پروتئین ها برای ایجاد کف بایستی در فاز مایع محلول بوده، در سطح مشترک تجمع یافته، جهت ایجاد لایه های پروتئینی چسبنده در اطراف ذرات هوا باز شده و ویسکوزیته و قدرت مکانیکی کافی به منظور جلوگیری از تخریب و انعقاد داشته باشند (25).

بویی و همکاران(2010) ظرفیت جذب آب را برای کنسانتره حبوبات(نخود فرنگی، نخود، عدس) (g/g)0/6-2/7 گزارش کردند، آنها اختلاف موجود در میزان جذب آب کنسانتره‌ها را به تفاوت ترکیب پروتئینی این حبوبات نسبت دادند(13). مانیندر کائور و همکاران(2007) با بررسی حلالیت ایزوله پروتئین نخودهای مختلف اظهار داشتند؛ با افزایش pH در محدوده اسیدی تا pH ایزوالکتریک حلالیت کاهش می‌یابد و بعد از آن حلالیت با بالا رفتن pH افزایش می‌یابد(17).

پاپالامپور و همکاران (2009) اثر روش تهیه ایزوله پروتئین نخود را بر ویژگی‌های امولسیونی مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که روش تهیه ایزوله به طور محسوس بر قدرت اجزاء پروتئین برای جذب اتصالات آب-روغن و ویژگی‌های ثبات بخصوص انعقاد و لخته شدن قطرات روغن تأثیر گذار است(23).

سینگ و همکاران (2008) در بررسی خواص عملکردی پروتئین نخودهای مختلف هندی اظهار داشتند که افزودن نمک (NaCl 10 g/l) یا شکر (Sucrose 100 g/l) باعث بهبود خصوصیات کف کنندگی ایزوله پروتئین نخود می‌شود که علت این پدیده را افزایش انحلال پذیری پروتئین تحت تأثیر افزودن نمک و شکر گزارش کردند(31).

هدف از این پژوهش ارزیابی خصوصیات عملکردی ایزوله پروتئین نخود بعنوان یک منبع غنی از پروتئین وبررسی تنوع فراکسیون‌های نیتروژنی ایزوله حاصل بود.

2- مواد و روش ها

2- 1-مواد مصرفی

نخود واریته فیلیپ از شرکت خدمات حمایتی کشاورزی اردبیل تهیه شد.

Archive of SID

www.SID.ir

2-1-1- مواد شیمیایی مصرفی شامل

هیدروکسید سدیم، اسید کلریدریک با درجه خلوص 37%، اسید سولفوریک 96%، گلیسرول 99/5% ، هگزان نرمال، سولفات مس، سولفات پتاسیم، اسید بوریک، تریس باز، گلایسین، آکریل آمید، بیس آکریل آمید، سدیم دو دسیل سولفات 0/1% ، بتامرکاپتواتانول، آمونیوم پرسولفات 10%، محلول TEMED[1]، کوماسی G-250 کلوئیدی[2]، تری کلرواستیک اسید همگی از شرکت مرک آلمان خریداری شد، برموفنل بلو، اتانول 96%، برموکرزول گرین، متیل بلو و پترولیوم اتر از شرکت سیگما، روغن ذرت از شرکت گلدن دروپ تهیه گردید.

2-2 روش‌ها

2-2-1-تهیه ایزوله پروتئین

ایزوله پروتئینی نخود بر اساس روش بویی و همکاران(2010) و کائور و سینگ(2007) همراه با اصلاحات، تهیه گردید(13و17).

2-2-1-1- آماده سازی آرد نخود

برای تهیه ایزوله پروتئین نخود، ابتدا نخود آسیاب صنعتی (توس شکن) گردید، سپس برای یکنواختی ابعاد از مش60 عبور داده شدند. آرد حاصل جهت حذف چربی به نسبت1 به 5 وزنی - حجمی با هگزان نرمال مخلوط گردید وبرای 1ساعت در دمای آزمایشگاه و به کمک همزن مغناطیسی، چربی گیری شد. سپس این مخلوط برای 15دقیقه در سانتریفوژ (Herolab) با دور8000g ودمای4°C جهت جداسازی آرد از هگزان قرار داده شد(13و17).

2-2-1-2-استخراج پروتئین نخود

ورود پروتئین‌ها به فاز محلول با استفاده از دو روش اسیدی (ایزولهA) و قلیایی (ایزوله B) انجام گردید. آرد نخود چربی گیری شده به نسبت1:15با آب مقطر به خوبی مخلوط شد(6و13و23)، سپس برای ایزولهB، pH توسط سود یک نرمال تا 9/5 و برای ایزولهA توسط اسید کلریدریک یک نرمال تا 2/5 تنظیم گردید. مخلوط حاصل برای 40 دقیقه به کمک همزن مغناطیسی با دور1400 دور بر دقیقه هم زده شد. نهایتاً بمدت 30 دقیقه در 7000g سانتریفوژ شد.

2-2-1-3- ترسیب در نقطه ایزوالکتریک

برای ترسیب پروتئین، به کمک اسید کلریدریک و سود یک نرمال، pH محلول حاصل از سانتریفوژ، در4/5 (نقطه ایزوالکتریک) تنظیم شد و در7000g برای15 دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس محلول شفاف رویی دور ریخته شد. برای داشتن خلوص بالاترپروتئین بازیابی شده به کمک سانتریفوژ در دور5000g برای 5 دقیقه طی دو مرحله شستشو داده شد. سپس پروتئین نهایی توسط خشک کن انجمادی (MARTIN CHRIST) به صورت پودر خشک گردید و تازمان استفاده در دمای2 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در مرحله بعد برای تعیین خلوص پروتئین از دستگاه کجلدال (Gerhardt) استفاده گردید (27).

$$\text{درصد ازت} = \frac{\text{وزن نمونه}/1/401 \times \text{نرمالیته اسید} \times \text{حجم مصرفی اسید}}{\text{ضریب پروتئین} \times \text{درصد ازت}} = \text{درصد پروتئین}$$

که در این رابطه ضریب پروتئین6/25 و نرمالیته اسید کلریدریک مصرفی 0/1 مول بر لیتر می‌باشد.

2-2-2 الکتروفورز پروتئین

به منظور بررسی فراکسیون‌های پروتئین نخود از الکتروفورز سدیم دو دسیل سولفات- پلی اکریل آمید (SDS-PAGE)[3] بر اساس روش لاملی(1970) (7)، از محلول‌های اکریل آمید 12/5% و 4% به ترتیب برای جداکردن و متراکم کردن استفاده گردید. نمونه‌ها بعد از آماده سازی به نسبت حجمی 4 به 1 با بافر مخلوط و در دمای 100 درجه سانتی گراد به مدت 5 دقیقه قرار گرفتند. در صورت کدورت یا وجود ذرات نا محلول، نمونه‌ها به مدت 10 دقیقه درg 10000سانتریفوژ شدند. سپس با سمپلر مناسب هر نمونه به دقت در چاهک ریخته شد. ولتاژ، تا رسیدن نمونه به مرز متراکم کننده و جدا کننده 70 ولت و سپس تا حد 150 ولت بالا برده شد. بعد از اتمام الکتروفورز، ژل در ظرف شیشه ایی قرار داده شد ومقدار کافی محلول ثبوت(20%) به آن اضافه گردید و حداقل یک ساعت روی شیکر با حرکت آرام قرار گرفت. ژل با محلول کوماسی G-250 رنگ شده، در انتها چندین بار با آب مقطر

[1]- N,N,N',N' - Tetra-methylendiamin
[2]- Coomassie Brilliant Blue G 250
[3]Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoreesis

Archive of SID
www.SID.ir

شستشو داده شد تا زمینه آن شفاف گردید(7). برای بررسی فراکسیون‌های نیتروژنی، ژل آماده شده اسکن گردید و وزن‌های مولکولی نسبی آن با مقایسه پروتئین استاندارد تعیین گردید.

2-2-3- انحلال پذیری پروتئین

برای تعیین میزان حلالیت پروتئین درpHهای مختلف، از روش کائور و همکاران(2007) استفاده شد(17). بدین منظور100میلی گرم از ایزوله پروتئین نخود در10 میلی لیتر آب مقطر حل شد. pH محلول‌ها با استفاده از سود و اسید کلریدریک 1نرمال در محدوده 2/5 تا 7 تنظیم شد و در دمای اتاق به مدت یک ساعت هم زده شد؛ حین آزمون دائماً pH محلول‌ها توسط pH متر (JENWA 3020) تنظیم گردید، سپس در5000g برای30 دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی جدا و از کاغذ صافی وات من 40 عبور داده شد. محتوی پروتئینی محلول با استفاده از روش میکروکلدال(N×6.25)تعیین گردید. حلالیت به صورت درصد پروتئین موجود در مایع رویی نسبت به محلول اولیه محاسبه شد. پروفیل حلالیت در برابر pH با رسم میانگین حلالیت پروتئین در pH های مختلف بدست آمد.

2-2-4- ظرفیت جذب آب

ظرفیت جذب آب یا ظرفیت نگه داری آب طبق روش استاندارد(AACC,2000) شماره20-56 اندازه گیری گردید(9). 1گرم نمونه در مبنای خشک درلوله سانتریفوژ از پیش توزین شده اضافه شد، سپس20 میلی لیتر آب مقطر به آن افزوده شدو برای10 دقیقه به سرعت هم زده شد. سپس مخلوط حاصل درg 2000 برای10 دقیقه در دمای 25 درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد. مایع رویی حاصل از سانتریفوژ دور ریخته شد و لوله‌ها به مدت چند دقیقه روی کاغذ صافی برای اطمینان ازتخلیه کامل آب واژگون نگه داشته شدند. پس از توزین مجدد لوله، میزان ظرفیت نگه داری آب محاسبه شد.

2-2-5- تشکیل امولسیون

امولسیون یک سیستم دو فازی است که از دو مایع مخلوط نشدنی که یکی از آنها به صورت قطرات مایع در فاز دیگر پراکنده شده است. تشکیل، ظرفیت و مقاومت امولسیون در برابر حرارت با استفاده از روش پاپالامپور و همکاران همراه با کمی تغییرات ارزیابی گردید (23). برای تهیه امولسیون، 0/9 گرم ایزوله نخود با 90 گرم آب مخلوط شد تا محلول شفاف 1% بدست آید و قسمت اعظم ایزوله در آب حل شده باشد. امولسیون روغن در آب (O/W: 10/90 V/V) با افزودن 10 میلی لیتر روغن به 90 میلی لیتر محلول ایزوله 1% با pH=7 در حالیکه نمونه توسط همزن مکانیکی در حال همزدن بود، تهیه شد و امولسیون اولیه بعد از 10 دقیقه مخلوط شدن با استفاده از هموژنایزر (Ultraturax) با سرعت 11000 دور بر دقیقه تحت دمای اتاق به مدت یک دقیقه هموژن گردید.

2-2-5-1- ظرفیت امولسیون کنندگی

امولسیون‌ها بلافاصله بعد از هموژن شدن به مدت 5 دقیقه در 1100g سانتریفوژ شدند. ظرفیت امولسیون کنندگی[1](EC) از تقسیم حجم امولسیون به حجم کل بدست می‌آید.

$$\text{ظرفیت امولسیونی} = \frac{\text{ارتفاع لایه امولسیون شده در لوله}}{\text{ارتفاع کل محتویات در لوله}}$$

2-2-5-2- ثبات امولسیون

امولسیون تهیه شده به مدت 30 دقیقه در دمای 80 درجه سانتی گراد قرارگرفت و سپس با دور 1100g به مدت 5 دقیقه در دمای اتاق، سانتریفوژ شد. ثبات امولسیون(ES) [2]از تقسیم حجم نهایی امولسیون به حجم اولیه بدست آمد.

2-2-6- وزن توده

برای اندازه گیری وزن توده، مقدار مشخصی ایزوله پروتئین نخود در یک مزور 10 میلی لیتری آهسته ریخته شد بدین ترتیب حجم نمونه برای محاسبه دانسیته توده نا متراکم بدست آمد (گرم /میلی لیتر). سپس نمونه با یک میله شیشه ای برای تعیین دانسیته توده متراکم فشرده شد (گرم /میلی لیتر)(13و17).

2-2-7- تعیین خاکستر و چربی

جهت اندازه گیری محتوی خاکستر ایزوله‌ها از روش استاندارد ملی به شماره 6950 استفاده شد(2). بدین ترتیب که مقدار1گرم ازایزوله در بوته ای که قبلا"به وزن ثابت رسیده بود، ریخته شد و برای خاکستر شدن به کوره ای با دمای c °550 درجه سلسیوس

[1] .Emulsion capacity
[2] .Emulsion stability

Archive of SID

www.SID.ir

انتقال داده شد. بعد از انجام مراحل فوق و اطمینان از انجام صحیح آن ، بوته را با پنس مخصوص از داخل کوره خارج و به دسیکاتور منتقل شد تا کاملا سرد شود. بعد از آن بوته را توزین گردید. عدد بدست آمده را در رابطه زیر قرار داده تا درصد خاکستر خام بدست آید.

$$\text{خاکستر} = \frac{(\text{وزن بوته+ خاکستر}) - (\text{وزن بوته خالی})}{\text{وزن نمونه}} \times 100$$

محتوی چربی ایزوله‌های پروتئینی با استفاده از روش استاندارد ملی به شماره 2862 اندازگیری شد(1). سیستم سوکسله که شامل قسمت استخراج کننده، مبرد برگردان و بالن تقطیر بوده خشک و توزین گردید. 2-3 گرم از نمونه در یک انگشتانه که فاقد چربی بود توزین شد، انگشتانه در استخراج کننده قرار گرفت و به آن مقدار کافی پترولیوم اتر اضافه شد. مبرد وصل و سپس مجموعه روی هیتر برقی قرار گرفت تا به آرامی به جوش آید و حداقل 10 بار محفظه استخراج کننده پر و خالی گردد. در انتها درصد چربی با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد.

$$\text{درصد چربی} = \frac{(\text{وزن بالن خالی})-(\text{وزن بالن +چربی})}{\text{وزن نمونه غذایی}} \times 100$$

2-4- آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل نتایج در رابطه باایزوله پروتئین نخود دو فاکتوره در قالب طرح کاملاً تصادفی ودر سه تکرارو مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن در سطح اطمینان 95 درصد انجام شد. برای انجام آنالیز واریانس از نرم افزار SAS ver 9.01 و برای رسم نمودارها از نرم افزار اکسل 2007 استفاده گردید.

3- نتایج و بحث

3-1- تولید ایزوله پروتئینی از نخود کابلی و تعیین راندمان و خلوص آن

ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی ایزوله A تولیدی به روش اسیدی (pH=2/5) و ایزولهB تولیدی به روش قلیایی(pH=9/5) تحت شرایط نسبت آب به ماده جامد 1:15، زمان استخراج40 دقیقه ودمای 25 درجه سانتی گراد، در جدول 1 قابل مشاهده است.

نتایج استخراج قلیایی، تقریباً با مشاهدات محققان برای نخود با خلوص بین 90-87٪ (32،27،17،13و37)، عدس با خلوص 82٪ و راندمان 12٪ (12)، کنسانتره وایزوله پروتئین سویا با خلوص 86-90/14٪ (4و21) مطابق بود. آلی وهمکاران(1993)، نیزتوسط روش اسیدی(pH=4)از لوبیای سفید، ایزوله پروتئین با خلوص95%، تولید نمودند(11).

3-2- الکتروفورز

پروفیل SDS- PAGE ایزوله‌های نخود بدست آمده بادوروش اسیدی وقلیایی در شکل1نشان داده شده است. ازآنجایی که آزمون الکتروفورزدرشرایط احیایی انجام شده ناحیه‌های مشخص شده در تصویر فقط مربوط به مونومرهای پروتئین نخود می‌باشند. پیوندهای دی سولفید درون یا بین زنجیره ای نقش عمده در شکل گیری ساختمان سوم و چهارم پروتئین‌ها دارند.

احیا ی این پیوندها با مواد تیول دار (مانند 2-مرکاپتواتانول) منجربه تجزیه پیوندهاوجدا شدن زیر واحدهای پروتئینی و بازشدن زنجیره‌های پلی پپتیدی می‌شود(7).

جدول1-خصوصیات فیزیکوشیمیایی ایزوله پروتئین نخود

نوع ایزوله	خلوص(%)	راندمان(%)	خاکستر(%)	چربی(%)	وزن توده متراکمg/ml	وزن توده نامتراکمg/ml
A	91/19	10	1/1	0/99	0/608	0/48
B	89	14/85	0/79	0/47	0/678	0/522

Archive of SID

www.SID.ir

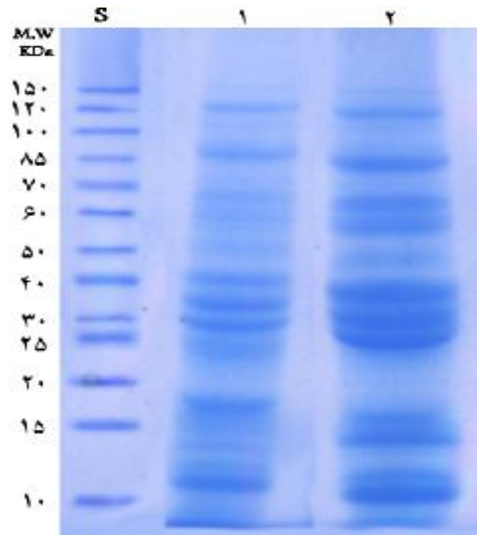
با وجود کاربرد دو روش مختلف برای تهیه ایزوله پروتئین نخود، ترکیب پروتئینی ایزوله‌A و B، تاحد زیادی شبیه هم بودند و تفاوت آنها در شدت و غلظت باندها بود. باندهای ظاهر شده درمحدوده 40-30 کیلودالتون احتمالاً مربوط به جزء اسیدی لگومین(11S) و باند 25 کیلودالتون نیز مربوط به جزء بازی آن است(38). باند 58 و65 کیلودالتون نیز مربوط به ویسیلین می‌باشد(14). احتمالاً بخش آلبومینی عصاره‌های پروتئینی درحین رسوب ایزوالکتریک حذف شده اند(23).

همانطور که قبلاً توضیح داده شد، استخراج پروتئین در مورد ایزوله‌B در pH =9/5 صورت گرفت و از آنجایی که لیو و همکاران(2008)، pH بهینه برای استخراج و جداسازی 11S و 7S گلوبولین را 8/5 اعلام کردند(20)، احتمالاً به علت نزدیک تر بودن pH ایزوله B نسبت به pH ایزوله A به این pH بهینه(8/5) راندمان استخراج و شدت باندهای این پروتئین‌ها در ایزوله B بیشتر بوده و در شکل 1 کاملاً مشهود است.

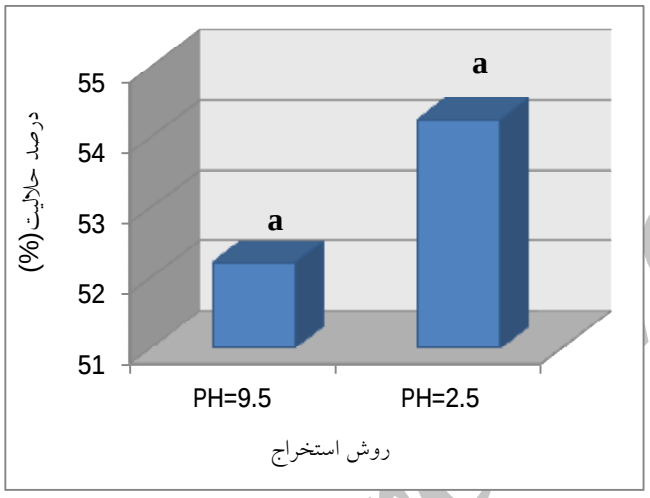
3 -3- انحلال پذیری پروتئین

3-3-1-اثر روش تهیه ایزوله پروتئینی بر حلالیت پروتئین

نظر به اینکه در بسیاری از سیستمهای غذایی وجود پروتئین به صورت محلول در سیستم، موردنظر و ضروری می‌باشد، خصوصیت انحلال پذیری پروتئین از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. نتایج آنالیز واریانس تأثیر روش استخراج ایزوله بر میزان حلالیت پروتئین گویای این واقعیت بود که بین ایزوله‌های تهیه شده با روش‌های اسیدی و قلیایی اختلاف آماری معنی داری مشاهده نگردید ($p<0.05$). اما ایزوله تهیه شده به روش اسیدی دارای حلالیت بالاتری نسبت به ایزوله تهیه شده با روش قلیایی بود (شکل2). ازآنجایی که افزایش pH از 2/5 به 9/5 خلوص ایزوله حاصل را کاهش می‌دهد، این کاهش خلوص، بر حلالیت پروتئین تأثیر منفی داشته است(8). کاهش خلوص پروتئین ممکن است به برخی از ویژگی‌های پروتئین از جمله حلالیت آن آسیب وارد نماید(5). فرهوش (1374) اظهار داشت، خروج بیشتر مواد غیر پروتئینی در pHهای بالاتر قلیایی می باشد(6). پاپالامپور و همکاران(2009) و کائور و همکاران(2007)، نیز حلالیت ایزوله پروتئنی نخود را مورد مطالعه قرار دادند(17و23)، که تقریباً مشابه نتایج این پژوهش می‌باشد.



شکل1- پروفیل SDS- PAGE بدست آمده تحت شرایط احیایی برای ایزوله پروتئین نخود تولید شده در شرایط قلیایی(2) و اسیدی(1)؛ شماره‌های سمت چپ وزن مولکولی پروتئین استاندارد می‌باشد.



شکل 2- میانگین حلالیت ایزوله پروتئین نخود تهیه شده با دو روش اسیدی و قلیایی

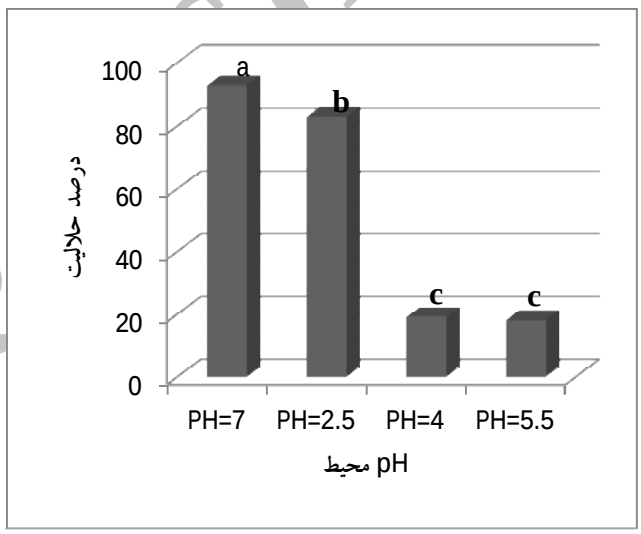
3-3-2- تأثیر pH محیط بر حلالیت

نتایج آنالیز واریانس نشان داد؛ بین pHهای مختلف اختلاف آماری معناداری وجود داشت($p<0.05$). با بررسی نمودارمشخص شد؛ ایزوله پروتئین نخود کابلی بیشترین حلالیت را در pHهای 2/5 و 7 و کمترین حلالیت را در pHهای 4 و5/5 داراست (شکل3). کائور وهمکاران(2007) کمترین حلالیت ایزوله پروتئین نخودهای کابلی ودسی را در pH 4و5 و بیشترین حلالیت را در pH 2/5 و 7 گزارش کردند(17). pH ایزوالکتریک بیشتر پروتئین‌های گیاهی در pH=4ـــ5 است(36). سانچز وهمکاران(1999) نقطهٔ ایزوالکتریک پروتئین‌های نخود را pH=4/3 اعلام کردند(27). در نقطه ایزوالکتریک پروتئین فاقد بار

Archive of SID

www.SID.ir

است، یعنی بارهای مثبت و منفی پروتئین با هم برابر بوده و هیچ واکنش متقابل دافع بین آنها وجود ندارد و این پدیده باعث رسوب پروتئین‌ها می شود، به عبارت دیگر پروتئین‌ها در این نقطه دارای کمترین حلالیت می باشند(29). با افزایش pH به سمت قلیایی ونیز دور شدن pH از نقطهٔ ایزوالکتریک به سمت pH اسیدی، پروتئین بیشتری جدا و حل می گردد (6). پاپالامپور و همکاران(2009)حلالیت ایزوله پروتئین نخود در محدود pH 3تا8 را بررسی کردند(23). کائور وسینگ(2007) به بررسی حلالیت ایزوله پروتئین نخود در محدود pH 2/5تا7 پرداختند(17). همچنین بویی و همکاران(2010) به مقایسه حلالیت ایزوله پروتئینی نخود، عدس و نخود فرنگی پرداختند(13). نتایج این پژوهش با نتایج نامبردگان مطابقت داشت.



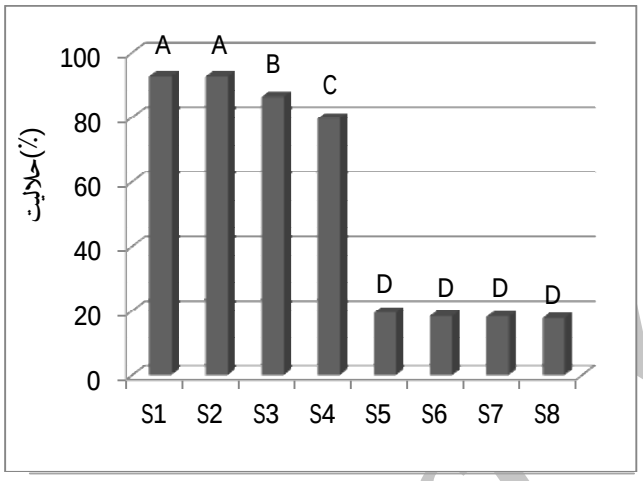
شکل 3- اثر تغییرات pH محیط بر حلالیت پروتئین

3-3-3-اثرمتقابل بین نوع روش تهیه ایزوله و تغییرات pH محیط بر حلالیت پروتئین

نتایج آنالیز واریانس نشان داد، اثر متقابل نوع روش تهیه ایزوله و تغییرات pH تأثیر معنی داری بر میزان حلالیت پروتئین داشت($p<0.05$). مطابق شکل4، ایزوله اسیدی نسبت به ایزوله قلیایی حلالیت بیشتری داشت؛این امر تحت تأثیر خلوص بالاتر ایزوله اسیدی نسبت به ایزوله قلیایی بود، با این حال، اختلاف معنی داری در حلالیت ایزوله پروتئین تهیه شده به روش قلیایی واسیدی درمحیط با pH=7 وجود نداشت ($p<0.05$). نتایج همچنین نشان دادند که در هر دو روش، نمونه‌های S5 وS6 ،S7 وS8 که در نزدیکی نقطه ایزوالکتریک قرار گرفته اند اختلاف معناداری از لحاظ آماری نداشتند($p<0.05$). درنزدیکی نقطه ایزوالکتریک به دلیل بوجود آمدن یون‌های دو قطبی، دافعه ی بین مولکولی کاهش یافته، اتصالات پروتئین-پروتئین ایجاد و از حلالیت پروتئین‌ها کاسته می‌شود(31).

جدول2-راهنمای شکل4

نمونه	گروه	حلالیت	pH	pH استخراج
S1	A	92/835	7	2/5
S2	A	92/7	7	9/5
S3	B	86/375	2/5	2/5
S4	C	79/674	2/5	9/5
S5	D	19/545	5/5	2/5
S6	D	18/556	5/5	9/5
S7	D	18/265	4	2/5
S8	D	17/91	4	9/5



شکل4- اثر متقابل روش تهیه ایزوله وتغییرات pHمحیط بر حلالیت.

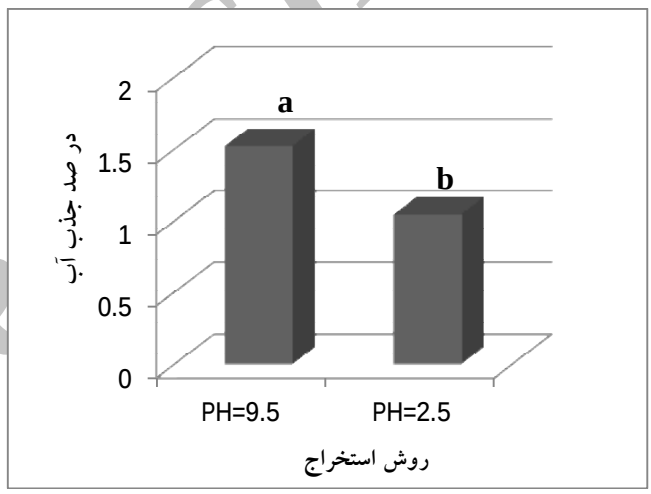
3- 4- ظرفیت جذب آب

جذب آب را باید مهمترین خصوصیت فیزیکی پروتئین‌ها دانست. این پدیده نه تنها بر ساختمان فیزیکی و خصوصیات ماده غذایی حاوی پروتئین نظیرخشک شدن عمیقاً اثر می‌گذارد، از نقطه نظرفساد ماده غذایی نیز، به دلیل تأثیری که بر میزان فعالیت آب دارد بسیار حائز اهمیت است. نتایج تجزیه و تحلیل آماری نشان داد؛ نوع روش بکار گرفته شده جهت استخراج پروتئین از نخود اثر معنی داری بر ظرفیت جذب آب ایزوله پروتئینی داشت ($p<0.05$)، به طوری که ایزوله تهیه شده به روش قلیایی(pH=9/5) نسبت به روش تهیه اسیدی، ظرفیت جذب آب بالاتری داشت(شکل5). پدیده اخیر بیانگر این امر بود که دناتوراسیون ایجاد شده در روش قلیایی و خروج بیشتر چربی

www.SID.ir

نسبت به روش اسیدی به افزایش ظرفیت جذب آب کمک کرده است(4). همچنین یکی دیگر از دلایل بالاتر بودن ظرفیت جذب آب این ایزوله می‌تواند ناشی از بیشتر بودن نا خالصی آن باشد(5). Boye ، Singh و همکاران در تحقیقات خود ظرفیت جذب آب ایزوله پروتئین واریته‌های کابلی (L-551) و (L-550) نخود را به ترتیب (g/g) 2/1و(g/g) 2/7گزارش کردند (13و31).

ظرفیت جذب آب ایزوله‌هایی که در این پژوهش با دو روش (قلیایی و اسیدی) تهیه شده بودند، کمتر از نتایج محققین نام برده در بالا بود؛ دلیل این پدیده می‌تواند ناشی از اختلاف واریته‌های نخود و تفاوت در محتوای مواد غیر پروتئینی ایزوله‌های ایزوالکتریک باشد(17). بر اساس نتایج بویی وهمکاران(2010) نوع واریته بر ظرفیت جذب آب پروتئین تأثیر بیشتری از نوع روش استفاده شده برای تهیه آن دارد(13).



شکل5- ظرفیت جذب آب ایزوله‌های تهیه شده به روش اسیدی و قلیایی

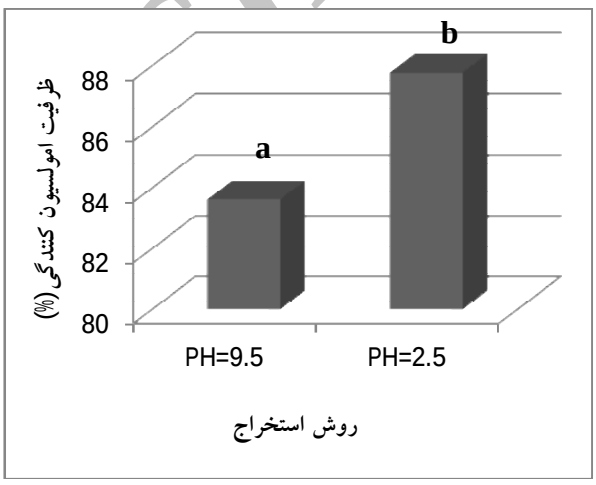
3-5- خصوصیات امولسیون کنندگی

پروتئین‌ها از آمینواسیدهای باردار، آمینو اسیدهای قطبی بدون بار و آمینو اسیدهای غیر قطبی تشکیل شده اند که این عوامل باعث شده اند پروتئین به عنوان یک امولسیفایر محسوب شود. داشتن هر دوخصوصیت آبدوستی و آبگریزی پروتئین را قادر ساخته بتواند به اتصال آب و روغن در سیستم غذایی متصل شود(35). حضور سورفاکتانت‌ها و ویژگی‌های فیزیکو شیمیایی آنها، تشکیل و ثبات امولسیون را تعیین می‌کنند. ظرفیت امولسیون کنندگی با افزودن پیوسته روغن به سوسپانسیون رقیق پروتئینی اندازه گیری می‌شود و نتایج به صورت حجم روغن امولسیفیه شده به ازای واحد وزنی پروتئین بیان می‌گردد(19)، در حالیکه پایداری امولسیون به مقاومت آن در برابر تغییرات ساختاری (از قبیل؛ انعقاد، خامه ای شدن، لخته شدن و ترسیب) و تغییراتی که با گذشت زمان روی می‌دهد، مربوط می‌باشد(20). نتایج آنالیز واریانس نشان داد که نوع روش تهیه ایزوله پروتئین دارای اثر معنی داری بر خصوصیات امولسیون کنندگی در سطح اطمینان 95 درصد بود(اشکال 6و7). بکارگیری روش اسیدی، ایزوله‌های با ظرفیت امولسیون کنندگی و پایداری بیشتر نسبت به روش قلیایی تولید نمود، که از دلایل این امر، می‌توان به تأثیرات نا مطلوب دناتوراسیون قلیایی(4) وحلالیت بالاتر ایزوله‌های تولید شده به روش اسیدی اشاره کرد. حلالیت در تشکیل امولسیون نقش مهمی را ایفا می‌کند. پروتئین‌هایی که حلالیت کمتری دارند امولسیفایرهای خوبی نیستند و باعث لخته شدن امولسیون می‌شوند(22). افزایش حلالیت پروتئین باعث نفوذ سریعتر پروتئین به داخل اتصالات آب-روغن می‌شود وباعث فعالیت امولسیون کنندگی پروتئین‌ها می‌شود(31). دناتوراسیون پروتئین‌ها قبل از امولسیون کردن به طوری که منجر به نا محلول شدن نشود به علت افزایش قابلیت انعطاف مولکولی و هیدروفوبیسیته سطحی، معمولاً باعث بهبود خصوصیات امولسیون کنندگی می‌شود(16و 32). در این پژوهش پایداری امولسیون ایزوله ای که به روش اسیدی تهیه شده بالاتر از پایداری امولسیون ایزوله تولید شده به روش قلیایی بود ($p<0.05$). از آنجا که تغییرات حین فرآیند می‌تواند منجر به تغییر نسبت گروههای هیدروفیل و هیدروفوب سطحی گردد فرآیند اسیدی اثری مثبت بر پایداری امولسیون داشته است. پایداری امولسیون بیشتر تابع نسبت گروهای هیدروفوب و هیدروفیل است؛ این پایداری توسط روش اسیدی بهبود بخشیده شده است(4). ظرفیت و پایداری امولسیون کنسانتره پروتئین نخود بدست آمده به روش قلیایی توسط چندین محقق ارزیابی شده است، که نتایج آنها به این شرح است؛ سینگ و همکاران (2008) خصوصیات امولسیون کنندگی کنسانتره‌های پروتئینی نخود در محلول‌هایی با pHهای 4/5 و7 درحضور یا غیاب شکر و نمک مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند؛ کنسانتره‌های پروتئینی نخود قادر به تولید امولسیون‌هایی با ثبات در غذاهای حاوی نمک و شکر می‌باشند(31). ظرفیت امولسیون کنندگی 63/7% برای ایزوله پروتئین نخودی که حاوی 84/8% پروتئین بود توسط پردس-لوپز(1991) گزارش شد(24). ژانگ و همکاران (2009) فعالیت امولسیون کنندگی برای ایزوله پروتئین نخود در pH =7 را

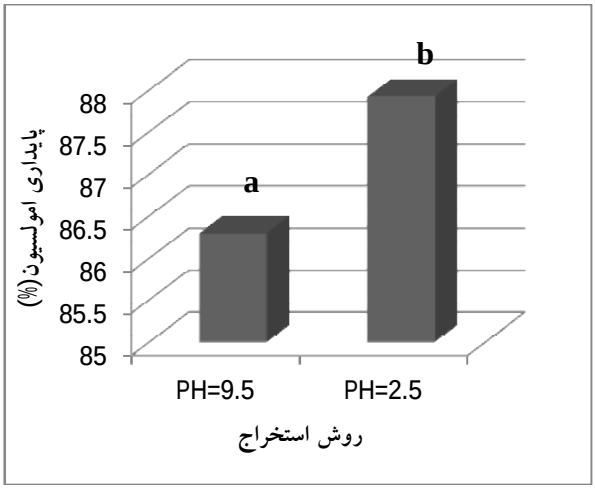
Archive of SID

www.SID.ir

معادل $253\ m^2/g$ گزارش نمودند(37). بویی و همکاران(2010) خصوصیات امولسیون کنندگی نخود، عدس، نخود فرنگی را باهم مقایسه کردند؛ بر این اساس نتایج آنها، بالاترین فعالیت امولسیون کنندگی را پروتئین نخودهای کابلی و دسی از خود نشان دادند(13). مقایسه ظرفیت امولسیون کنندگی بین مطالعات مختلف به دلیل اثرات چشمگیر تغییرات اندک شرایط آزمایشگاهی بر ظرفیت امولسیون کنندگی دشوار است(17). ظرفیت و ثبات بالای امولسیونی پروتئین برای استفاده از آن در فراورده‌های غذایی نظیر؛ کیک، قهوه، سس، بسیار با اهمیت می‌باشد(10). با توجه به ظرفیت و ثبات امولسیونی بالای ایزوله پروتئین نخود که در این پژوهش بدست آمد، می‌توان از نخود در فرمولاسیون فراورده‌های غذایی استفاده نمود.



شکل6- ظرفیت امولسیون ایزوله پروتئین نخود بدست آمده با دو روش استخراج



شکل7- پایداری و ثبات امولسیون ایزوله‌های پروتئین نخود در برابر حرارت

4-نتیجه گیری

فرآیند استخراج اسیدی در مقایسه با روش قلیایی، با خروج بهتر کربوهیدرات‌ها، میزان حلالیت، محتوی چربی و پروتئین را افزایش داد. از مزایای روش اسیدی به تولید محصولی نسبتاً محلول و از معایب آن به بازده کمتر این روش نسبت به روش قلیایی می‌توان اشاره کرد. ایزوله‌های پروتئینی در محیط‌های اسیدی و قلیایی دارای حلالیت بالایی بودند اما با نزدیک شدن به نقطه ایزوالکتریک از حلالیت آنها کاسته شد. ظرفیت جذب آب ایزوله حاصل از روش قلیایی به علت خروج بیشتر چربی و تغییرات ناشی از دناتوراسیون و ناخالصی بیشتر نسبت به روش اسیدی، بالاتر بود. روش اسیدی باعث تولید ایزوله‌هایی با ظرفیت امولسیون کنندگی و پایداری بیشتر نسبت به روش قلیایی گردید، که از دلایل این امر، می‌توان به تأثیرات نامطلوب دناتوراسیون قلیایی و حلالیت بالاتر ایزوله‌های تولید شده به روش اسیدی اشاره کرد. با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان ادعا کرد که پروتئین نخود دارای پتانسیل بالقوه برای استفاده در فرمولاسیون انواع فرآورده‌های غذایی بر پایه ی پروتئین می‌باشد و با وجود هزینه بالای پروتئین‌های حیوانی، جایگزین کردن پروتئین گیاهی به جای پروتئین حیوانی، می تواند برخی از مشکلات سوء تغذیه را در کشورهای جهان سوم حل کند

5- منابع

1. استاندارد ملی ایران 2862: سال 1349،غلات و حبوبات و فراورده‌های آن.

2. استاندارد ملی ایران 6950: سال 1371 ،غلات و حبوبات و فراورده‌های آن-آرد نخود-ویژگی‌ها و روش‌های آزمون.

3. باقری، ع. پارسا، م.1387. حبوبات. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد.

4. رواقی دارانی، م. 1389. " بررسی تولید و خشک کردن بر ویژگی‌های عمل کنندگی کنسانتره پروتئین حاصل از آردهای صنعتی سویا" پایان نامه ارشد دانشکده« صنایع غذایی» دانشگاه فردوسی مشهد.

5. فاطمی، ح. 1378. شیمی مواد غذایی: تهران: سهامی انتشار .

6. فرهوش، ر. 1374. بررسی امکان تولید ایزولهٔ پروتئین سویا پایان نامه کارشناسی ارشد «صنایع غذایی» دانشگاه تربیت مدرس تهران.

Archive of SID

www.SID.ir

7. مصطفایی، ع. 1382. راهنمای نظری و عملی الکتروفورز پروتئین در ژل. ویراست دوم. یادآوران تهران.

8. میلانی، الف. 1389. ارزیابی ویژگی‌های عملکردی ایزوله پرتئین نخود. طرح مصوب جهاد دانشگاهی کد(402)

9. AACC. 2000. American association of cereal chemists. Approved method 56-30 (10th ed.). St. Paul, MN, USA.

10. Adebowale1, Y. A., Adeyemi, I. A., Oshodi A. A.,2005, Functional and physicochemical properties of flours of six *Mucuna* species. *Journal of Biotechnology* Vol. 4 (12), pp. 1461-1468.

11. Alli, I., Gibbs, B.F., Okoniewska, M.K., Konishi, Y., & Dumas, F. 1993. Identification and characterization of phaseolin polypeptides in a crystalline protein isolated from white kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, NO. 41, PP. 1830–1834.

12. Bora, P. S., 2002, Functional properties of native and succinylated lentil (Lens culinaris) globulins. *Food Chemistry, NO. 77, PP. 171–17 6.*

13. Boye, J.I., Aksay, S., Roufik, S., Ribéreau, S., Mondor, M., Farnworth, E. Rajamohamed, S.H., 2010 , Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultra filtration and isoelectric precipitation techniques. *Journal of Food Research International* 43, 537–546.

14. Clemente A, Vioque J, Sanchez R, Pedrocha J, Baustista J and Millan F. 2000. Factors affecting the in-vitro protein digestibility of chickpeas albumins. *J Sci Food Agric* 80:79–84.

15. Fenema, O.R. 1996. *Food Chemistry*. 3rd ed, Marcel Dekker Incorporation. USA.

16. Fillery-Travis, A., Mills, E.N.C., and Wilde, P., 2000, Protein-lipid interaction at interfaces. Grasas Y Aceites, 51: 50-55.

17. Kaur, M., & Singh, N.2007. Characterization of protein isolates from different Indian chickpea (*Cicer arietinum L.*) cultivars. *Food Chemists*, NO.102, PP. 366–37.

18. Kinsella, J.E. 1979. Functional properties of soy proteins. *Journal of American Oil Society Chemists , 56: 242-258.*

19. Liu, k., and Limbert, W.F. 2004. Soy flour: varieties, processing, properties, and application. In: Liu, K. (ed), soy bean as functional foods and ingredients. AOCS press. USA

20. Liu, C., Wang, H., Cui, Z., He, X., Wang, X., Zeng, X., and Ma, h. 2008. Optimization of extraction and isolation for 11S and 7S globulins of soybean seed storage protein. *Food Chemistry*, 102 1310–1316.

21. Martins, V.B., Netto, F.M. 2006. Physicochemical and functional properties of soy protein isolate as a function of water activity and storage. *Journal of Food Research International*, 39 145–153.

22. Moure, A., J. Sineiro, J., Herminia Domınguez, H., Parajo, J.C. 2006. Functionality of oilseed protein products: A review. *J. Food Research International* 39, 945–963.

23. Papalamprou,E,M., Doxastakis,G ,I., and Kiosseoglou,V. 2009 . Chickpea protein isolates obtained by wet extraction as emulsifying agent. *Journal Sci Food Agric*; **90**: 304–313.

24. Paredes-Lopez, O., Ordorica-Falomir, C., & Olivares-Vazquez, M. R. 1991. Chickpea protein isolates: physicochemical, functional and nutritional characterization. *Journal of Food Science,* 56(3), 726–729.

25. Philips, R.D., and Finely, J.W. 1989. Protein quality and the effects of processing , Marcel Dekker Incorporation, USA

26. Rakosky, J., 1974. Soy grits, flour, concentrates and isolates in meat products. *Journal of the American Oil Chemists Society , 57(7): 123-127.*

27. Sanchez-Vioque, R., Climente, A., Vioque, J., Bautista, J., & Millan, F., 1999, Protein isolate from chickpea (*Cicer areitinum L.*): chemical composition, functional properties and protein characterization. *J. Food Chemistry*, NO.64, PP.237–243.

28. Shahidi, F., 1990. Canola and rapeseed production, Chemistry, Nutrition and Processing Technology. *Van Nostrand Reinhold New* York. pp: 291-350.

29. Singh, D. K., Rao, A. S., & Singh, R. 1988. Amino acid composition of storage proteins of a promising chickpea (*Cicer arietinum L.*) cultivar. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 43, 373–379.

30. Singh, N., Kaur, M., & Sandhu, K. S. 2005. Physicochemical and functional properties of freeze-dried and oven dried corn gluten meals. J . *Drying Technology*, 23, 1–14.

31. Singh, G., Wani, A.A,. Kaur,D, and Dalbir Singh Sogi, D. 2008. Characterization and functional properties of proteins of some Indian chickpea (*Cicer arietinum*) cultivars. *J Sci Food Agric* 88:778–786.

32. Singh, U., & Jambunathan, R. 1982. Distribution of seed protein fractions and amino acids in different anatomical parts of chickpea

Archive of SID

www.SID.ir

(*Cicer arietinum L.*) and pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). *Plant Foods for Human Nutrition,* 31, 347–354.
33. Sun, X.S., Wang, D., Zhang, L., Mo, X., Zhu, L., and Bolye, D., 2008. Morphology and phase separation of hydrophobic clusters of soy globular protein polymers. *Macromolecular Bio science,* 8: 295-303.

34. Vani, B., & Zayas, J. F. 1995. Wheat germ protein flour solubility and water retention. *Journal of Food Science*, 60, 845–848.
35. Yu, J., Ahmedna, M., Goktepe, I. 2007. Peanut proteins concentrate: Production and functional properties as affected by processing. *Journal of Food Chemistry* 103, 121–129
36. Yust, M. M., Pedroche, J., Giro´ n-Calle, J., Alaiz, M., Milla´ n, F., & Vioque, J. 2003. Production of ace inhibitory peptides by digestion of chickpea legumin with alkalase. *Food Chemistry*, 81, 363–369.
37. Zhang, T., Jiang, B Mu, W., Wan, Zh. 2009. Emulsifying properties of chickpea protein isolates: Influence of pH and NaCl . *Journal of Food Hydrocolloids* 23, 146–15

Archive of SID

www.SID.ir