DOI: http://dx.doi.org/ 10.22104/jift.2020.3911.1921

فصلنامه فناوری‌های جدید در صنعت غذا، دوره۸، شماره۳، صفحه ۳۴۸-۳۳۷، بهار ۱۴۰۰

مقاله پژوهشی

بررسی ویژگی‌های عملکردی پروتئین‌های هم‌رسوبی استخراج شده از ضایعات هسته‌های انار و انگور

محمد قربانی[1*]، عادله محمدی[2]، سید دانیال مجربی[2]

۱. دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۲. دانشجوی دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۸/۱۸ ، تاریخ آخرین بازنگری: ۱۳۹۸/۱۰/۱۰، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۵/۰۶)

چکیده

هم‌رسوبی پروتئین یک روش اقتصادی جهت تولید فراورده‌های غذایی با پروتئین بالا و ویژگی‌های عملکردی مناسب است. هسته گیاهان به عنوان مکمل رژیم‌های غذایی و نیز منابع پروتئینی ارزان قیمت محسوب می‌گردند. هسته‌های انگور و انار به عنوان ضایعات صنعت غذا منابع سودمند پروتئینی می‌باشند. در این تحقیق از بافر فسفات (pH=۷) حاوی نمک سدیم کلرید (۳/۵ ٪) جهت استخراج اولیه استفاده گردید، سپس ویژگی‌های عملکردی پروتئین هم‌رسوبی هسته‌های انگور و انار در مقادیر اشباع شده ۴۰، ۵۵ و ۷۵٪ نمک سولفات آمونیوم مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت با توجه به نتایج الکتروفورز، غلظت اشباع شده ۵۵٪ انتخاب گردید. ویژگی‌های امولسیون کنندگی، پایداری امولسیون، ظرفیت نگهداری آب و روغن، حلالیت و ویسکوزیته نمونه‌های سوپرناتانت و رسوب مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج بیشترین میزان حلالیت سوپرناتانت و رسوب به ترتیب در pH = ۶ و pH =۱۲ قرار داشت. فعالیت امولسیون کنندگی پروتئین‌های سوپرناتانت در محدوده ۱۳/۳۷- ۴/۹۵ m^2/g و فعالیت امولسیون کنندگی پروتئین‌های رسوب در محدوده ۱۶/۸۳-۸/۸۴ m^2/g قرار داشت. همچنین پایداری امولسیون‌های حاصل از پروتئین‌های سوپرناتانت ۲۳/۵۹ min- ۱۵/۶۰ و پایداری امولسیون‌های حاصل از پروتئین‌های رسوب هم‌رسوبی انگور- انار ۳۹/۹۱- ۱۷/۷۴ دقیقه تعیین شد. نتایج مشخص ساختند که پروتئین‌های موجود در رسوب قابلیت جذب آب بیشتری (۱/۶۸ gr/gr) نسبت به پروتئین‌های سوپرناتانت (۰/۲۴ gr/gr) دارند ($p<۰/۰۵$). پروتئین‌های موجود در سوپرناتانت از قابلیت جذب روغن بیشتری (۴/۷۶ gr) نسبت به پروتئین‌های رسوب (۱/۰۴ gr) برخوردار بودند ($p<۰/۰۵$). بر اساس نتایج نمونه سوپرناتانت ۱۰٪ پروتئین‌های هم رسوبی انگور- انار بیشترین ویسکوزیته را در بین سایر نمونه‌ها نشان داد و ویسکوزیته آن در محدوده ۲/۲۶-۱/۱۵ cp قرار داشت. نتایج بررسی پروفایل الکتروفورز پروتئین‌های هم‌رسوبی انگور-انار مشخص ساخت که با استفاده از بافر فسفات (pH=۷) و نمک سولفات آمونیوم ۵۵٪ می‌توان پروتئین‌های موجود در هسته انگور- انار را به صورت پروتئین های محلول و رسوب داده جداسازی نمود. از این ترکیبات می‌توان جهت غنی‌سازی فراورده‌هایی مانند سوپ‌ها، خمیرها، فراورده‌های نانوایی و غیره استفاده نمود.

کلید واژه‌ها: پروتئین هم‌رسوبی، ویژگی‌های عملکردی، هسته انگور، هسته انار، آمونیوم سولفات

* نویسنده مسئول: m.ghorbani@gau.ac.ir

۱. مقدمه

پیشرفت‌های صورت گرفته در زمینه فرآیند هم‌رسوبی که طی دو دهه گذشته رخ داده، باعث تولید انواع مختلف پروتئین‌ها از مخلوط مواد اولیه در سطح تجاری گردیده است. استفاده از این نوع پروتئین‌ها طی این فرآیند باعث بهبود ویژگی‌های عملکردی و تغذیه‌ای بسیاری از فراورده‌های غذایی می‌گردد [۱]. ترکیب دامنه وسیعی از ویژگی‌های عملکردی، فیزیکی و ویژگی‌های تغذیه‌ای بالا سبب می‌شود که پروتئین‌های هم رسوب بتوانند به عنوان یک جزء ترکیبی در محصولات غذایی مختلف مورد استفاده قرار گیرند. ویژگی‌های عملکردی پروتئین‌های غذایی عامل مهمی در فرآیندهای غذایی و فرمولاسیون محصولات غذایی محسوب می‌گردد. برخی از این ویژگی‌ها شامل امولسیون کنندگی، تشکیل کف، ویسکوزیته و ژلاتیناسیون می‌باشند. این ویژگی‌ها تحت تأثیر فاکتورهای طبیعی پروتئین مانند ساختار و اندازه مولکولی و فاکتورهای محیطی مانند روش جداسازی پروتئین، قدرت یونی، pH و حضور سایر مؤلفه‌ها در سیستم‌های غذایی قرار دارد [۲]. الودت و همکاران ویژگی‌های پروتئین هم رسوب آب پنیر و سویا را بررسی نمودند. نتایج این مطالعه مشخص ساخت که دما، pH و عوامل شلاته کننده پارامترهای تأثیرگذاری در فرآیند هم رسوبی آب پنیر و سویا به شمار می‌آیند. این محققین گزارش دادند که بیشترین عملکرد فرآیند رسوب‌دهی پروتئین‌های آب پنیر و سویا در pH= ۴/۵ و دمای ۹۸ °C انجام می‌شود [۳]. تحقیقات یوسف و همکاران پیرامون بررسی ویژگی‌های پروتئین هم‌رسوبی دانه‌های روغنی و حبوبات مشخص ساخت که پروتئین‌های هم رسوب حاصل از منابع گیاهی ارزش تغذیه‌ای بالاتر، ویژگی‌های عملکردی بهتر، عوامل ضد تغذیه‌ای کمتر، هضم بهتر دارند و همچنین ترکیب اسیدهای آمینه ضروری آنها نیز بهتر می‌باشد [۴].

یکی از چالش‌های دنیای مدرن مسئله ضایعات و پسماندهای کارخانه‌های صنایع غذایی است، پسماندهای میوه‌ها در صنعت به عنوان ضایعات تلقی می‌شوند و ارزش اقتصادی بالایی ندارند، لیکن منابعی غنی از ترکیبات زیست فعال محسوب شده که می‌توان از آنها در فرمولاسیون محصولات غذایی و دارویی استفاده نمود [۵]. ترکیبات فعال موجود در پسماندها و تفاله میوه‌ها جهت بهبود ویژگی‌های تغذیه‌ای و حسی فرمولاسیون‌های غذایی به کار می‌رود [۶]. تفاله انار یک محصول ضایعاتی است که شامل پوست، پالپ و هسته‌ها می‌باشد و محصول فرعی کارخانه‌های آب‌گیری هسته انار محسوب می‌گردد. کاربرد تفاله از نظر تغذیه‌ای، سلامتی و دارا بودن فعالیت آنتی‌اکسیدانی حائز اهمیت است [۷]. هسته انار از ارزش تغذیه‌ای بالایی برخوردار است زیرا که گزارش شده است منبعی غنی از فیبر خام، لیپیدها و پروتئین است [۸]. به طوری که تحقیقات یانگ و همکاران مشخص ساخت که مقدار پروتئین هسته انار gr/kg ۱۳۰-۱۰۰ وزن دانه را تشکیل می‌دهد [۹]. هسته انگور نیز متشکل از ۴۰٪ فیبر، ۱۶٪ روغن، ۱۱٪ پروتئین و سایر ترکیباتی مانند ترکیبات فنولی، قندها و مواد معدنی می‌باشند. همچنین هسته انگور منبع غنی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی است و عصاره آن مزایای سلامتی بخش مختلفی دارد [۱۰]. با افزایش جمعیت جهان تقاضا برای محصولات سرشار از پروتئین افزایش یافته و همچنین نیاز مداوم به اصلاح سازی ویژگی‌های عملکردی و تغذیه‌ای پروتئین‌ها لزوم تحقیقات بیشتر در این زمینه را مشخص می‌نماید. لذا هدف از این تحقیق بررسی امکان جداسازی و مقایسه ویژگی‌های عملکردی پروتئین هم‌رسوب موجود در سوپرناتانت و رسوب هسته انار- دانه انگور بود.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. مواد اولیه

دانه‌های انگور و انار (مخلوطی از ارقام تجاری با تولید بالا در ایران) از شرکت شفادانه گرگان تهیه گردید. روغن آفتابگردان از شرکت لادن طلایی و سایر مواد شیمیایی از شرکت‌های مرک و سیگما آلدریچ خریداری گردید.

۲.۲. آماده‌سازی آرد هسته انگور و انار

دانه‌های انگور و انار تهیه شده آسیاب گردیدند و توسط هگزان چربی‌زدایی شد. به این صورت که پودر هسته‌ها به طور جداگانه به مدت h ۴ به روش غوطه‌وری همراه همزدن (آلفا - ایران) به نسبت ۱ به ۵ در معرض حلال هگزان در

دمای محیط قرار گرفت. بعد از فرآیند حلال زدایی، دانه‌ها مجدداً آسیاب و از الک با مش ۵۰ به منظور یکنواختی اندازه ذرات پودر عبور داده شدند. نسبت‌های یکسان (۱:۱ W:W) از آرد هسته‌ها با هم مخلوط گردید. پودرهای حاصل در کیسه‌های پلاستیکی و تا زمان آزمایش در یخچال (دمای ۴ °C) نگهداری شد [۱۱].

۳.۲. آزمون‌های شیمیایی

رطوبت، چربی، خاکستر و پروتئین مخلوط هسته انار و هسته انگور بر اساس روش AOAC اندازه‌گیری شد [۱۲].

۴.۲. استخراج پروتئین‌ها

به منظور استخراج پروتئین از روش میلر و همکاران با کمی تغییرات استفاده شد [۱۳]. از بافر فسفات (pH=۷) حاوی نمک سدیم کلرید (۳۵ gr/L) جهت فرآیند استخراج استفاده گردید. به این صورت که آردهای هسته انار- انگور به نسبت ۷:۱ با بافر فسفات حاوی نمک مخلوط شده و به مدت Hour ۲ بر روی همزن مغناطیسی (مدپایپ- ایران) در دمای اتاق قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها به مدت min ۳۰ و rpm ۵۰۰۰ سانتریفیوژ (هتیچ - آلمان) شدند. سوپرناتانت و رسوب از هم جدا شده و در یخچال نگهداری شدند.

۵.۲. ترسیب پروتئین با نمک سولفات آمونیوم

ترسیب پروتئین‌ها با استفاده از نمک سولفات آمونیوم (۴۰، ۵۵ و ۷۵٪) انجام گردید [۱۴]. محلول سوپرناتانت با مقادیر مشخصی از سولفات آمونیوم مطابق با جداول اشباع شده به مدت min ۱۵ در دمای محیط بر روی همزن مغناطیسی مخلوط شدند، سپس نمونه‌ها به مدت h ۱/۵ در یخچال قرار گرفتند و در نهایت به مدت min ۳۰ سانتریفوژ شدند (۵۰۰۰ rpm). به منظور جداسازی نمک آمونیوم سولفات، محلول سوپرناتانت به کیسه‌های دیالیز D9652 (۱۴۰۰۰ Da سیگما-آلمان) منتقل شدند و در آب مقطر به مدت h ۲۴ قرار گرفت (آب مقطر هر ۶ ساعت تعویض گردید). جهت فعال‌سازی کیسه دیالیز به مدت سه دقیقه در محلول در حال جوش EDTA (۲٪) قرار گرفت.

۶.۲. ژل الکتروفورز پلی اکریلامید SDS-PAGE

ژل الکتروفورز پروتئین هسته انار و دانه انگور و کنسانتره هم رسوب دانه انار- انگور طبق روش لاملی انجام شد [۱۵]. نمونه پروتئین در بافر نمونه حاوی SDS ۲٪، گلیسرول ۱۰٪، بتامرکاپتواتانول ۵٪، Tris-HCl ۶۲/۵ mmol (pH=۶/۸) و برموفنل بلو ۰/۰۰۲٪ تهیه شد. ژل جمع کننده حاوی ۵٪ و ژل جدا کننده حاوی ۹٪ اکریل آمید بودند. ژل نهایی درون محلول بافری شامل تریس mmol ۲۵، گلایسین mmol ۱۹۲ و SDS ۰/۱٪ قرار گرفت. بعد از اتمام فرآیند جهت رنگ‌آمیزی ژل از محلول حاوی ۱۰٪ اسید استیک، ۷/۵ ٪ متانول و کوماسی بریلیانت بلو R استفاده شد. سپس مرحله رنگ‌بری با محلول رنگ‌بر (۱۰٪ اسید استیک و ۱۰٪ متانول) انجام گرفت. همچنین در این مطالعه از مارکرهای تریس-گلایسین شرکت سیناکلون استفاده شد.

۷.۲. تعیین ویژگی‌های عملکردی

۱.۷.۲. حلالیت

حلالیت پروتئین هسته انار- انگور در pH های مختلف به روش ور و همکاران با کمی تغییرات اندازه‌گیری گردید [۱۶]. آرد پروتئین دانه انار- انگور به نسبت (W/V) ۱:۲۰ با آب مقطر مخلوط گردید. pH مخلوط حاصل با استفاده از هیدروکسید سدیم و اسید کلریدریک M ۱ به محدوده ۲-۱۲ رسانده شد. سوسپانسیون حاصل به مدت h ۱ در دمای محیط قرار گرفت که در این حین، مخلوط کردن به کمک همزن مغناطیسی انجام گرفت و سپس pH نمونه‌ها توسط pH متر (لب ترون- ایران) دوباره تنظیم گردید. نمونه‌ها به مدت min ۱۵ سانتریفیوژ (۶۰۰۰ rpm) شدند. غلظت پروتئین سوپرناتانت هر نمونه که معرف پروتئین‌های محلول بودند به روش بیورت اندازه‌گیری شد. حلالیت نشان دهنده میزان پروتئینی است که در جزء محلول پروتئین قرار دارد و از طریق رابطه (۱) محاسبه گردید. جهت رسم منحنی استاندارد از غلظت‌های µg/ml ۱۰۰-۵ پروتئین کازئین استفاده شد.

$$\text{درصد حلالیت پروتئین} = \frac{\text{پروتئین موجود در نمونه}}{\text{پروتئین کل}} \times 100 \qquad (۱)$$

۲.۷.۲. ظرفیت جذب آب

۰/۰۰۱ Kg پودر پروتئین در مبنای خشک در لوله فالکون از پیش وزن شده شده قرار گرفت و سپس ۲۰ ml آب مقطر به آن افزوده شد. نمونه پس از اختلاط به مدت ۱۰ min در دمای ۲۵ °C (۳۵۰۰ rpm) سانتریفیوژ گردید. مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ دور ریخته شد. سپس برای اطمینان از تخلیه کامل آب، لوله‌ها به مدت چند دقیقه روی کاغذ صافی واژگون نگه داشته شدند. پس از وزن شدن مجدد، مقدار جذب آب توسط رابطه (۲) محاسبه گردید [۱۲].

$$\text{جذب آب}(gr/gr) = \frac{\text{مقدار گرم آب جذب شده}}{\text{مقدار گرم نمونه}} \quad (۲)$$

۳.۷.۲. ظرفیت جذب روغن

ظرفیت جذب روغن عبارت است از مقدار گرم روغنی که به وسیله یک گرم پروتئین جذب می‌شود. یک گرم نمونه پروتئین با ۱۰ ml روغن آفتابگردان در لوله فالکون مخلوط و به مدت ۱۰ min در دمای ۲۵ °C سانتریفیوژ (۳۵۰۰ rpm) گردید. پس از سانتریفیوژ بخش مایع فوقانی دور ریخته شد و لوله‌ها به مدت چند دقیقه روی کاغذ صافی واژگون نگه داشته شدند و مقدار جذب روغن توسط رابطه (۳) محاسبه گردید [۱۲].

$$\text{جذب روغن}(gr/gr) = \frac{\text{مقدار گرم روغن جذب شده}}{\text{مقدار گرم نمونه}} \quad (۳)$$

۴.۷.۲. تعیین قدرت امولسیون کنندگی و پایداری امولسیون

خصوصیات امولسیون کنندگی پروتئین‌های استخراج شده مطابق با روش پیرس و کینسلا تعیین گردید [۱۷]. طبق این روش، ۱۰ ml روغن آفتابگردان با ۳۰ ml میلی‌لیتر محلول پروتئین مخلوط و pH نمونه‌ها به کمک اسید کلریدریک و سود به ۸،۶،۴ و۱۰ رسانده شد. سپس مخلوط به مدت ۳ min با سرعت ۱۱۰۰۰ rpm با استفاده از هموژنایزر هموژن گردید. در ادامه ۵۰ µl از امولسیون تولید شده با ۵ ml محلول سدیم دودسیل سولفات (۰/۱٪) مخلوط شده و جذب بلافاصله و ۱۰ min پس از تشکیل امولسیون در ۵۰۰ nm اندازه‌گیری شد. قدرت امولسیون کنندگی و پایداری امولسیون با استفاده از روابط (۴) و (۵) محاسبه گردید:

$$\text{قدرت امولسیون کندگی}\left(\frac{m^2}{g}\right) = \frac{\text{فاکتور رقت}\times 2.303\times 2\times\text{جذب در دقیقه صفر}}{10{,}000\times\text{وزن پروتئین}\times\text{حجم جزء روغن}} \quad (۴)$$

$$\text{پایداری امولسیون}(min) = \frac{\text{جذب در دقیقه صفر}\times\text{زمان}(10\ \text{دقیقه})}{\text{جذب در دقیقه صفر}-\text{جذب در دقیقه } 10} \quad (۵)$$

۴.۷.۲. ویسکوزیته

غلظت‌های (W/V) ۱، ۲، ۵ و ۱۰٪ از پروتئین حاصل در آب مقطر (pH= ۷) تهیه شد و به مدت ۱ h در دمای اتاق نگهداری شد و سپس ویسکوزیته نمونه‌ها با استفاده از ویسکومتر (دی وی-II- بروکفیلد) اندازه‌گیری شد [۱۸].

۸.۲. آنالیز آماری

به منظور آنالیز داده‌ها و بررسی اطلاعات آزمایش‌های از طرح کاملاً تصادفی استفاده شد. جهت تعیین اختلاف میانگین داده‌ها پس از آنالیز واریانس با روش ANOVA از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۹۵٪ استفاده گردید. تجزیه و تحلیل آماری نتایج با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS 16 انجام شد. رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار اکسل انجام گردید. آزمون‌ها با سه تکرار انجام گرفت.

۳. نتایج و بحث

۱.۳. ویژگی‌های شیمیایی

ویژگی‌های شیمیایی مخلوط هسته‌های انار- انگور در جدول (۱) مشخص شده است.

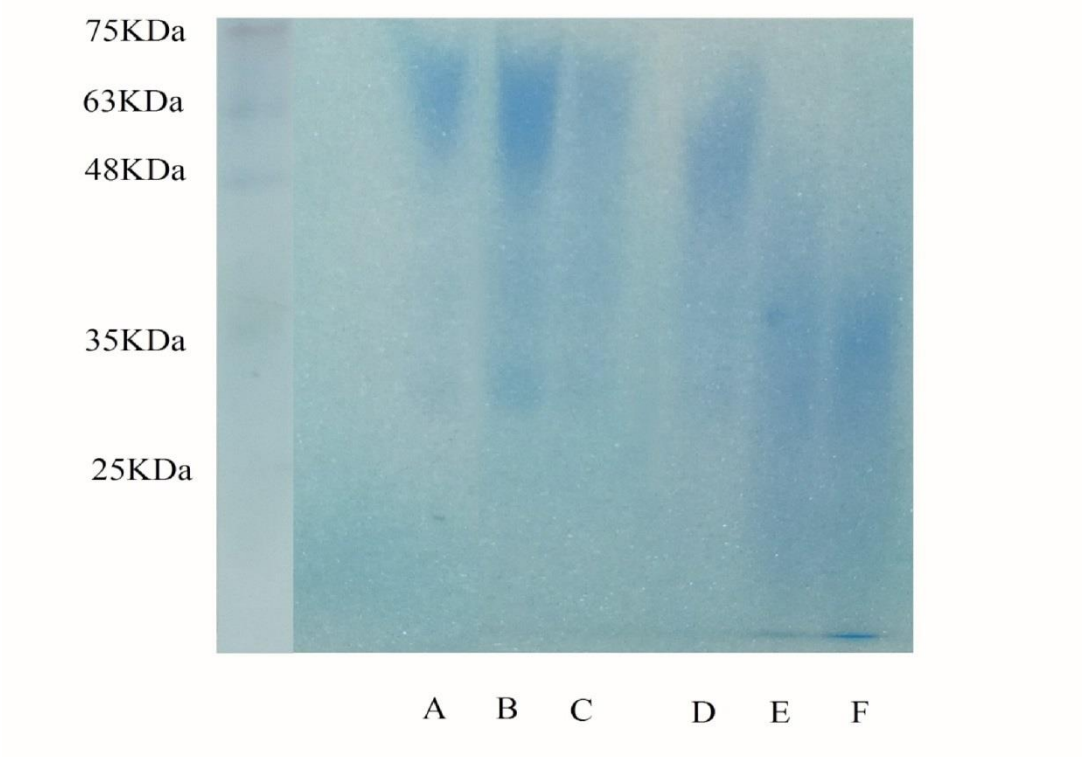
جدول (۱) ویژگی‌های شیمیایی هسته‌های انار- انگور

Table 1. Chemical properties of pomegranate-grape seeds

نمونه Sample	پروتئین٪ Protein%	چربی٪ Fat %	رطوبت٪ Moisture%	خاکستر٪ Ash%
دانه انار-انگور pomegranate-grape seeds	12.25±0.07	10.60±0.14	8.8±0.19	5.6±0.21

۲.۳. الگوی الکتروفورز

جهت دست‌یابی به الگوی الکتروفورز مناسب پروتئین‌های هم رسوبی انگور- انار، پارامترهای مؤثر در فرآیند استخراج (نسبت نمونه به بافر، غلظت نمک کلرید سدیم و زمان)، میزان اشباع شده سولفات آمونیوم (۴۰، ۵۵ و ۷۵) و الکتروفورز (غلظت ژل‌ها و غلظت بارگذاری نمونه‌ها) تغییر یافت و از نتایج هر مرحله جهت تعیین شرایط فرآیند در مراحل بعدی استفاده گردید. پروفایل SDS-PAGE پروتئین‌های استخراج شده توسط بافر فسفات (نسبت نمونه: بافر۵۰۰:۵۰)، نمک کلرید سدیم (۳۵ gr/L)، زمان استخراج ۶ h و سولفات آمونیوم ۵۵٪ در شکل (۱) مشخص شده است. پروتئین‌های رسوب هم‌رسوبی انگور- انار در محدوده‌ی وسیع ۷۵-۱۱ kDa قابل مشاهده بودند. پروتئین‌های موجود در سوپرناتانت نمونه‌ها نیز در محدوده‌ی ۲۵-۷۵ kDa تجمع زیادی دارند. با توجه به نتایج الکتروفورز مشخص شد که می‌توان با استفاده از غلظت ۵۵٪ سولفات آمونیوم اشباع پروتئین‌ها را در دو بخش سوپرناتانت و رسوب جداسازی نمود. عدم ایجاد باندهای واضح ممکن است به علت تداخل نمک موجود در نمونه‌ها انجام شده باشد. اگرچه وضوح باندهای پروتئینی ایده‌آل است اما با همین مقدار وضوح تصمیم‌گیری برای جداسازی امکان پذیر بود.



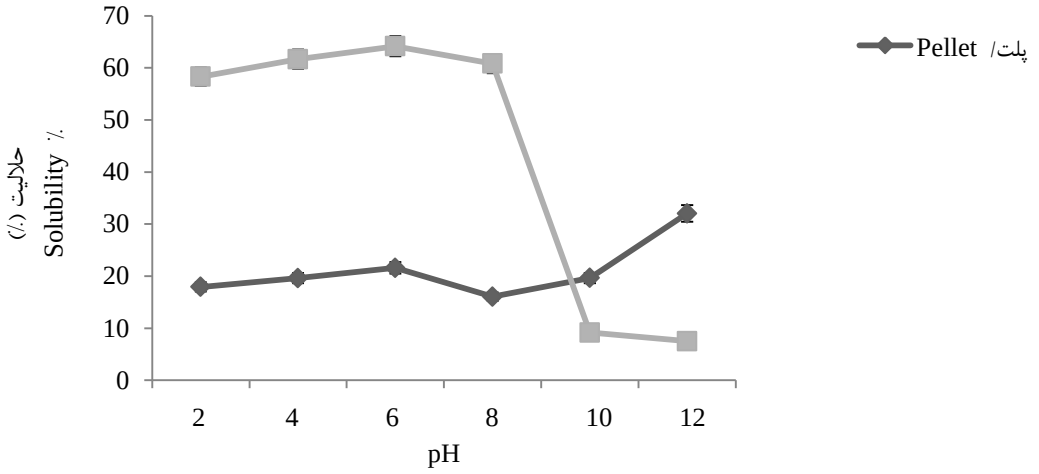
شکل (۱) پروفایل الکتروفورز پروتئین هم رسوبی انگور- انار . A-C: سوپرناتانت (غلظت بارگذاری نمونه‌ها افزایش یافت)، D-F: رسوب هم‌رسوبی انگور- انار (غلظت بارگذاری نمونه‌ها افزایش یافت).

Fig 1. SDS–PAGE electropherogram of grape-pomegranate co-precipitates proteins; A-C: supernatant (The loading concentration of the samples increased), D-F:pellet (The loading concentration of the samples increased).

۳.۳. حلالیت

در میان ویژگی‌های عملکردی پروتئین‌ها، حلالیت یکی از مهم‌ترین و اساسی‌ترین ویژگی‌ها می‌باشد که بر روی کاربرد آن در فرمولاسیون مواد غذایی تأثیر مستقیم دارد؛ پروتئین باید به صورت محلول باشد تا بتواند سایر ویژگی‌های عملکردی خود را نشان دهد [۱۹]. حلالیت پروتئین‌های هم‌رسوبی انگور- انار در شکل (۲) مشخص شده است. کمترین میزان حلالیت پروتئین‌های سوپرناتانت در pH =۱۲

و بیشترین میزان حلالیت در ۶ = pH مشاهده گردید. با افزایش pH از ۲ الی ۶ افزایش محسوسی در مقدار حلالیت پروتئین‌های سوپرناتانت مشاهده شد و از pH ۸ الی ۱۲ میزان حلالیت سیر نزولی داشت. پروتئین‌های رسوب کمترین میزان حلالیت را در ۸ = pH و بیشترین میزان حلالیت را در ۱۲ = pH نشان دادند. افزایش حلالیت پروتئین‌های موجود در رسوب ممکن است به دلیل بارهای منفی مولکول‌های پروتئینی در این pH باشد که باعث افزایش نیروهای دافعه و واکنش بیشتر با مولکول‌های آب می‌گردد. حلالیت پروتئین تحت تأثیر تعاملات پروتئین - پروتئین و پروتئین - حلال و توازن سطوح هیدروفوبیک- هیدروفیلیک پروتئین قرار دارد [۲۰].

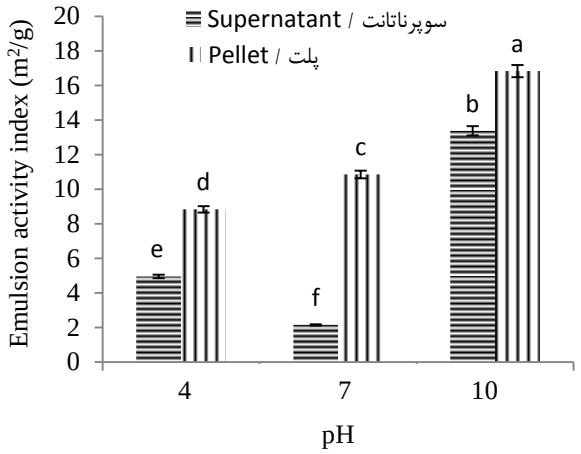


شکل (۲) حلالیت پروتئین‌های هم رسوبی انگور-انار درpH های مختلف

Fig 2. Solubility of grape-pomegranate co-precipitates proteins at different pHs

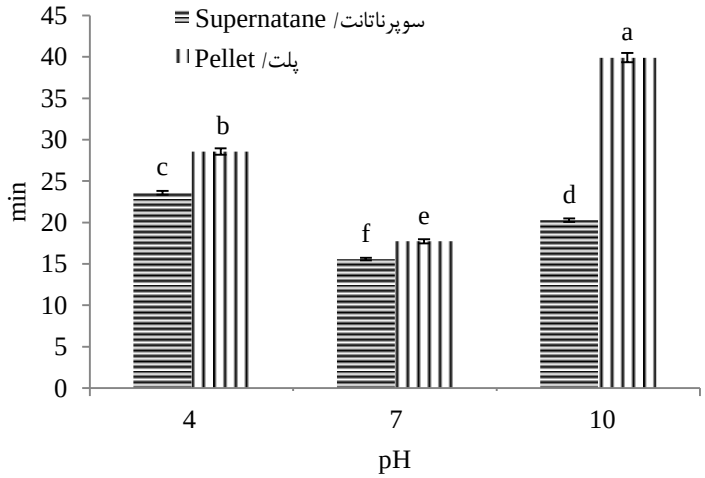
۴.۳. فعالیت امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون

شاخص فعالیت امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون دو پارامتر کلیدی نشان‌دهنده ویژگی امولسیون‌کنندگی پروتئین هستند. شاخص فعالیت امولسیون مقیاسی جهت بررسی ظرفیت تشکیل امولسیون توسط پروتئین است درحالی‌که پایداری امولسیون مقیاسی است که توانایی پروتئین جهت تشکیل امولسیون پایدار را در یک دوره زمانی مشخص تعیین می‌نماید [۲۲ -۲۱]. در شکل (۳) میزان فعالیت امولسیون-کنندگی پروتئین‌های سوپرناتانت و رسوب هم‌رسوبی انگور-انار در سه pH متفاوت مشخص شده است. به طورکلی فعالیت امولسیون کنندگی پروتئین‌های سوپرناتانت در محدوده m^2/g ۱۳/۳۷- ۴/۹۵ و فعالیت امولسیون کنندگی پروتئین‌های رسوب در محدوده m^2/g ۱۶/۸۳-۸/۸۴ قرار گرفت. همان‌طور که در شکل مشخص است بیشترین فعالیت امولسیون‌کنندگی پروتئین‌های هم‌رسوبی موجود در سوپرناتانت و رسوب در ۱۰= pH مشاهده می‌گردد ($p<۰/۰۵$). این امر نشان می‌دهد که در این pH تغییرات ایجاد شده در ساختار پروتئین‌ها منجر به افزایش فعالیت امولسی‌فایری شده، به طوری که آنها را قادر ساخته تنش‌های بین سطحی را کاهش دهند و تشکیل قطرات کوچک روغن را تسهیل نمایند. امولسی‌فایرهای برتر در کاهش تنش سطحی توانا بوده و از بهم پیوستن قطرات روغن در امولسیون از طریق افزایش پراکندگی قطرات روغن ممانعت می‌نمایند، همچنین باعث افزایش تعاملات فاز آبی-روغنی شده و باعث ایجاد ثبات در سطوح غشاءها می‌شوند [۲۳]. جین و همکاران [۲۴] میزان فعالیت امولسیون کنندگی ایزوله‌ی پروتئین بادام زمینی را m^2/g ۵/۴۳ و شوکانی و همکاران [۲۵] نیز فعالیت امولسیون کنندگی ایزوله پروتئین لوبیا سبز را m^2/g ۸/۹- ۷/۷ گزارش دادند.



شکل (۳) فعالیت امولسیون کنندگی پروتئین‌های هم‌رسوبی انگور- انار در pH های متفاوت
Fig 3. The emulsifying activity of grape-pomegranate co-precipitates proteins at different pHs

شکل (۴) میزان پایداری امولسیون‌های حاصل از پروتئین‌های سوپرناتانت و رسوب هم‌رسوبی انگور- انار را نشان می‌دهد. پایداری امولسیون‌های حاصل از پروتئین‌های سوپرناتانت min ۲۳/۵۹-۱۵/۶۰ و پایداری امولسیون‌های حاصل از پروتئین‌های رسوب هم‌رسوبی انگور- انار min ۳۹/۹۱-۱۷/۷۴ می‌باشد. بیشترین پایداری امولسیون در pH =۱۰ توسط پروتئین‌های رسوب و کمترین پایداری در pH =۷ توسط پروتئین‌های سوپرناتانت مشاهده گردید ($p<۰/۰۵$). نتایج مشخص ساختند که پایداری امولسیون‌ها تحت تأثیر تغییرات pH قرار دارد. کاهش در مقدار پایداری امولسیون‌ها با گذشت زمان ممکن است به دلیل تماس بیشتر بین مولکول‌ها و در نتیجه تجمع (لخته شدن) و به هم پیوستن قطرات روغن به عنوان فاز پراکنده باشد [۲۶]. در مطالعه سایر محققین پایداری امولسیون حاصل از آرد هسته آلبالو min ۳۷/۴۹ کنسانتره پروتئین بادام زمینی min ۱۹/۱۸ گزارش شده است [۲۸-۲۷]. عوامل مختلفی مانند منبع پروتئین، غلظت، ویژگی‌های ساختاری و سطحی پروتئین‌ها، حلالیت، دما، pH، تجهیزات و روش مورد استفاده جهت تولید امولسیون، در زمره پارامترهای تاثیرگذار بر خصوصیت امولسیون کنندگی پروتئین محسوب می‌گردد [۲۵].



شکل (۴) پایداری امولسیون‌های حاصل از سوپرناتانت و رسوب پروتئین های هم رسوبی انگور-انار در pH های متفاوت
Fig 4. The emulsions stability of grape-pomegranate co-precipitates proteins at different pHs

۵.۳. ظرفیت نگهداری آب

ظرفیت جذب آب یک ویژگی عملکردی مهم جهت فراورده‌های غذایی ویسکوز مانند سوپ‌ها، خمیرها، فراورده‌های امولسیونی گوشتی و فراورده‌های نانوایی محسوب می‌گردد. پروتئین‌های موجود در این محصولات بدون انحلال قادرند آب را حفظ نموده که این امر باعث افزایش ویسکوزیته و ثبات ساختاری می‌شود [۲۹]. ظرفیت جذب آب پروتئین هم‌رسوبی انگور- انار حاصل از سولفات آمونیوم ۵۵٪ در جدول (۲) مشخص شده است. نتایج مشخص ساختند که پروتئین‌های موجود در رسوب قابلیت جذب آب بیشتری (۱/۶۸ gr/gr) نسبت به پروتئین‌های سوپرناتانت (۰/۲۴ gr/gr) دارند (p<۰/۰۵). ظرفیت جذب آب بالا برای حفظ تازگی و احساس چشایی مطلوب در فراورده های نانوایی لازم است و به حفظ رطوبت در این فراورده‌ها کمک می‌کند [۳۰]. طبق مطالعات انجام گرفته در این زمینه ظرفیت نگهداری آب ایزوله پروتئین باقلا ۱/۸ gr/gr، ایزوله پروتئین سویا ۱/۳ gr/gr و کنسانتره پروتئینی بادام هندی نیز ۱/۷۴ gr/gr گزارش شده است [۳۲-۳۱]. ظرفیت نگهداری آب شاخص سودمندی است که توانایی ترکیب شدن ایزوله‌ها و یا کنسانتره‌های پروتئینی در فرمولاسیون غذاهای بر پایه آب را مشخص می‌نماید [۲۷].

جدول (۲) ظرفیت جذب آب و روغن پروتئین های هم‌رسوبی انگور-انار

Table 2. Water and oil holding capacity of grape-pomegranate co-precipitates proteins

نمونه Samples	ظرفیت جذب آب Water holding capacity (gr/gr)	ظرفیت جذب روغن Oil holding capacity (gr/gr)
سوپرناتانت supernatant	0.24±0.01[b]	4.76±0.06[a]
رسوب Pellet	1.68±0.04[a]	1.04±0.01[b]

در هر ستون اعداد با حروف یکسان دارای تفاوت معنی‌داری نیستند (p<۰/۰۵).

In each column, numbers with the same letters do not have a significant difference (P<0.05).

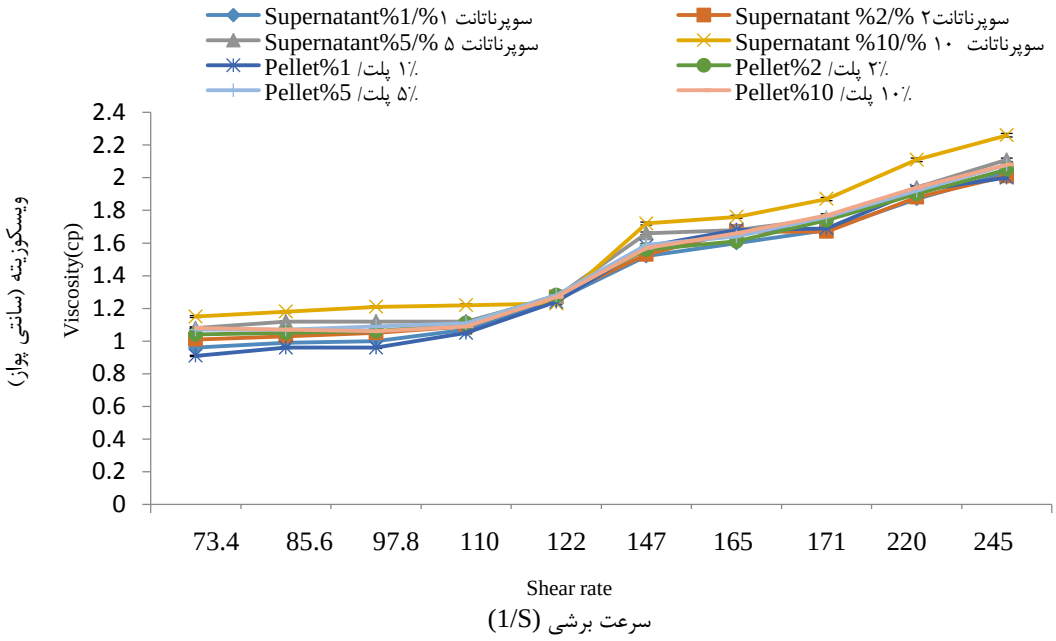
۶.۳. ظرفیت نگهداری روغن

برهم‌کنش بین پروتئین‌ها و لیپیدها تعیین کننده ویژگی‌های حسی بسیاری از محصولات غذایی می‌باشد. این تعاملات تحت تأثیر pH، قدرت یونی، دما و سایر متغیرهای موجود در سیستم قرار دارند [۲۷]. ظرفیت جذب روغن عبارت است از مقدار گرم روغنی که به وسیله یک گرم پروتئین جذب می‌شود. ظرفیت جذب روغن پروتئین هم رسوبی انگور- انار حاصل از سولفات آمونیوم ۵۵٪ در جدول (۲) مشخص شده است. همان‌طور که مشخص شده پروتئین‌های موجود در سوپرناتانت قابلیت جذب روغن بیشتری (۴/۷۶ gr/gr) نسبت به پروتئین‌های رسوب (۱/۰۴ gr/gr) دارند (p<۰/۰۵). پروتئین‌ها با حلالیت کم و آبگریزی زیاد می‌توانند مقادیر زیادتری روغن را نگه دارند. پروتئین‌ها با اندازه ذرات کوچک‌تر و تراکم کمتر می‌توانند مقادیر بیشتری روغن را نگهداری نمایند [۲۷]. طبق مطالعات انجام گرفته در این زمینه ظرفیت نگهداری روغن کنسانتره پروتئین بادام هندی ۳/۳۲ gr/gr و ایزوله پروتئین بادام زمینی ۲ gr/gr است [۲۸،۳۱]. ظرفیت نگهداری روغن شاخصی سودمند جهت کاربرد کنسانتره و ایزوله‌های پروتئینی در فراورده‌های گوشتی و تقلیدی محسوب می‌گردد [۲۷].

۷.۳. ویسکوزیته

ویسکوزیته یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های مواد غذایی محسوب شده که بر احساس دهانی، بافت مایعات مانند نوشیدنی‌ها و فرآیندهایی مانند اکستروژن، خشک کردن و نیز بر عملیاتی همچون پمپاژ و همزدن مایعات تاثیرگذار است. انتخاب غلظت مناسب در پایداری ژل‌های غذایی تأثیر به‌سزایی دارد به نحوی که اگر غلظت بطور مناسب انتخاب گردد، سوسپانسیون پروتئینی می‌تواند بعد از فرآیندهای

گرمایشی- سرمایشی ژل مناسبی را تشکیل دهد [۲]. ویسکوزیته پروتئین‌های سوپرناتانت و رسوب هم رسوبی انگور- انار با غلظت‌های (W/V) ۱، ۲، ۵ و ۱۰٪ بررسی گردید (شکل ۵). همان‌طور که مشاهده می‌گردد با افزایش سرعت برشی میزان ویسکوزیته نمونه‌ها افزایش یافت اما اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف پروتئین‌های هم رسوبی سوپرناتانت و رسوب مشاهده نگردید. نمونه سوپرناتانت ۱۰٪ بیشترین ویسکوزیته را در بین سایر نمونه‌ها نشان داد و ویسکوزیته آن در محدوده ۲/۲۶-۱/۱۵ cp قرار داشت.



شکل (۵) ویسکوزیته سوسپانسیون پروتئین‌های هم‌رسوبی انگور-انار
Fig 5. Viscosity of suspension of grape-pomegranate co-precipitates proteins

۴. نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش ویژگی‌های عملکردی پروتئین هم‌رسوبی هسته‌های انگور و انار در غلظت‌های ۴۰، ۵۵ و ۷۵٪ نمک سولفات آمونیوم اشباع شده مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت با توجه به نتایج الکتروفورز غلظت ۵۵٪ انتخاب گردید. نتایج بررسی پروفایل الکتروفورز پروتئین‌های هم‌رسوبی انگور- انار مشخص ساخت که با استفاده از بافر فسفات (pH=۷) و نمک سولفات آمونیوم ۵۵٪ می‌توان پروتئین‌های موجود در هسته انگور- انار را به صورت سوپرناتانت و رسوب جداسازی نمود. با توجه به ویژگی‌های متفاوت این دو بخش می‌توان از هر بخش در فرآیند معین یا به منظور خاصی استفاده نمود. این فراورده‌ها جهت غنی‌سازی فرمولاسیون محصولاتی مانند سوپ‌ها، خمیرها، فراورده‌های گوشتی و فرآورده‌های نانوایی قابل استفاده می‌باشد.

منابع

[1] Alu'datt, M. H., Al-Rabadi, G. J., Alli, I., Ereifej, K., Rababah, T., Alhamad, M. N., & Torley, P. J. (2013). Protein co-precipitates: A review of their preparation and functional properties. *Food Bioprod.*

Process., *91*, 327-335.
[2] Yu, J., Ahmedna, M., & Goktepe, I. (2007). Peanut protein concentrate: Production and functional properties as affected by processing. *Food Chem.*, *103*, 121-129.
[3] Alu'datt, M. H., Alli, I., & Nagadi, M. (2012). Preparation, characterization and properties of whey-soy proteins co-precipitates. *Food Chem.*, *134*, 294-300.
[4] Youssef, A. M., Abu-Foul, N. S., & Moharram, Y. G. (1995). Preparation and characteristics of coprecipitate proteins from oilseeds and legumes seeds. *Food/Nahrung.*, *39*, 475-482.
[5] Martínez, R., Torres, P., Meneses, M. A., Figueroa, J. G., Pérez-Álvarez, J. A., & Viuda-Martos, M. (2012). Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of mango, guava, pineapple and passion fruit dietary fibre concentrate. *Food Chem.*, *135*, 1520-1526.
[6] Mahfoudhi, N., Ksouri, R., & Hamdi, S. (2016). Nanoemulsions as potential delivery systems for bioactive compounds in food systems: Preparation, characterization, and applications in food industry. In: Mihai Grumezescu. A (Eds.). Emulsions (pp. 365-403) Academic Press.
[7] Samadloui, H.R., Azizi, M.H., & Barzegar, M. (2006). Investigation of Physicochemical Properties of Ten Varieties of Yazd Pomegranate Seed. *IJFST.*, *3*, 19-26. [In Persian]
[8] Aviram, M., Dornfeld, L., Rosenblat, M., Volkova, N., Kaplan, M., Coleman, R., Hayek, T., Presser, D., & Fuhrman, B. (2000). Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E–deficient mice. *AM J CLIN NUTR.*, *71*, 1062-1076.
[9] Yang, H., Li, M., Qi, X., Lv, C., Deng, J., & Zhao, G. (2012). Identification of seven water-soluble non-storage proteins from pomegranate (Punica granatum Linn.) seeds. *Food Sci. Technol. Int.*, *18*, 329-338.
[10] Costa, G.N., Tonon, R. V., Mellinger-Silva, C., Galdeano, M.C., Iacomini, M., Santiago, M.C., Almeida, E.L., & Freitas, S.P. (2019). Grape seed pomace as a valuable source of antioxidant fibers. *J. Sci. Food Agric.*, *99*, 4593-4601.
[11] Sogi, D.S., Arora, M.S., Garg, S. K., & Bawa, A.S. (2002). Fractionation and electrophoresis of tomato waste seed proteins. *Food Chem.*, *76*, 449-454.
[12] AOCS. (2007). Official methods and recommended practices of the American oil chemist's Society.
[13] Miller, M. K., Schonhorst, M. H., & McDaniel, R. G. (1972). Identification of Hybrids from Alfalfa Crosses by Electrophoresis of Single Seed Proteins 1. *Crop Sci.*, *12*, 535-537.
[14] Nooralabettu, K. P. (2014). Optimisation of ammonium sulfate precipitation method to achieve high throughput concentration of crude alkaline phosphatase from Brown shrimp (Metapenaeus monoceros) hepatopancreas. *Int J Anal Bio-Sci.*, *2*, 7-16.
[15] Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.*, *227*(5259), 680-685.
[16] Were, L., Hettiarachchy, N. S., & Kalapathy, U. (1997). Modified soy proteins with improved foaming and water hydration properties. *J. Food Sci.*, *62*, 821-824.
[17] Pearce, K. N., & Kinsella, J. E. (1978). Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. *J. Agric. Food Chem.*, *26*, 716-723.
[18] Beuchat, L. R. (1977). Functional and electrophoretic characteristics of succinylated peanut flour protein. *J. Agric. Food Chem.*, *25*, 258-261.
[19] Mohamed, I. S., Osman, A., Wahdan, K. M., & Sitohy, M. Z. (2019). Chemical Evaluation and Functional Properties of Luffa Seeds Protein. *ZJAR.*, *46*, 467-474.
[20] Horax, R., Hettiarachchy, N., Kannan, A., & Chen, P. (2011). Protein extraction optimisation, characterisation, and functionalities of protein isolate from bitter melon (Momordica charantia) seed. *Food Chem.*, *124*, 545-550.
[21] 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 ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. *Food Res. Int.*, *43*, 537-546.
[22] Kumar, K. S., Ganesan, K., Selvaraj, K., & Rao, P. S. (2014). Studies on the functional properties of protein concentrate of Kappaphycus alvarezii (Doty) Doty–An edible seaweed. *Food chem.*, *153*, 353-360.
[23] Adebiyi, A. P., & Aluko, R. E. (2011). Functional properties of protein fractions obtained from commercial yellow field pea (Pisum sativum L.) seed protein isolate. *Food Chem.*, *128*, 902-908.
[24] Jain, A., Prakash, M., & Radha, C. (2015). Extraction and evaluation of functional properties of groundnut protein concentrate. *J. Food Sci. Technol.*, *52*, 6655-6662.
[25] Shevkani, K., Kaur, A., Kumar, S., & Singh, N. (2015). Cowpea protein isolates: functional properties and application in gluten-free rice muffins. *LWT--Food Sci. Technol.*, *63*(2), 927-933.
[26] Keshavarz Hedayati, A.A., Alami, M., Motamedzadegan, A., Maghsoodlou, Y., & Ghorbani,

M. (2014). Functional Properties of Iranian Rice Bran Protein Concentrates. *EJFPP*., 6, 17-33. [In Persian]

[27] Güzel, M., Çelik, M., & Yildirim, M. (2019). Effect of pH on Protein Extraction from Mahaleb Kernels and Functional Properties of Resulting Protein Concentrate. *Int. J. Food Eng.*, *15*, 3023-3032.

[28] Wu, H., Wang, Q., Ma, T., & Ren, J. (2009). Comparative studies on the functional properties of various protein concentrate preparations of peanut protein. *Food Res. Int.*, *42*, 343-348.

[29] Seena, S., & Sridhar, K. R. (2005). Physicochemical, functional and cooking properties of under explored legumes, Canavalia of the southwest coast of India. *Food Res. Int.*, *38*, 803-814.

[30] Chandi, G. K., & Sogi, D. S. (2007). Functional properties of rice bran protein concentrates. *J. Food Eng.*, *79*, 592-597.

[31] Ogunwolu, S. O., Henshaw, F. O., Mock, H. P., Santros, A., & Awonorin, S. O. (2009). Functional properties of protein concentrates and isolates produced from cashew (Anacardium occidentale L.) nut. *Food Chem.*, *115*, 852-858.

[32] Fernández-Quintela, A., Macarulla, M. T., Del Barrio, A. S., & Martínez, J. A. (1997). Composition and functional properties of protein isolates obtained from commercial legumes grown in northern Spain. *Plant Foods Hum. Nutr.*, *51*, 331-341.

Research Article

Investigation of functional properties of protein co-precipitates extracted from pomegranate and grape seeds

Mohammad Ghorbani[1*], Adeleh Mohammadi[2], Seid Danial Mojarabi[2]

1. Associate Professor, Department of Food science and technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
2. Ph. D. Student, Department of Food science and technology, Gorgan university of Agricultural Sciences and Natural Resources

Abstract

The protein co-precipitate is an economical method to produce high-protein foods with appropriate functional properties. The wide range of functional, physical, and nutritional properties of protein co-precipitates makes it possible for their using as an ingredient in various food products. Seeds are a source of low cost, which can be used for dietary supplements food. Grape and pomegranate seeds are useful sources of protein as food waste. The efficient utilization of waste to produce high-value food products reduces the costs waste disposal in the food industry. Therefore, isolation and purification of the proteins of food factories waste are necessarily needed for their optimal using. In this study,the functional properties of grape and pomegranate seeds protein co-precipitated were investigated at 40, 55 and %75 ammonium sulfate. Finally, %55 saturation of ammonium sulfate was selected according to the results of electrophoresis. The functional properties of produced proteins including emulsion activity, emulsion stability, oil and water holding capacity, solubility and viscosity of the samples were investigated. The results showed that the highest solubility of supernatant protein and pellet protein was obtained at pH = 6 and pH = 12, and the emulsion activity of supernatant and pellet were 4.95-13.37 m2/g and 8.84-16.83 m^2/g, respectively.Also, the emulsion stability of the supernatant proteins was 15.60-23.59 min, and the emulsion stability of the pellet grape-pomegranate co-precipitated proteins was 17.74- 39.91 min. The results showed that the proteins in the pellet had higher water holding capacity (1.68 g) than the supernatant proteins (0.24 g) ($p < 0.05$). The proteins in the supernatant were more capable of holding oil (4.76 g) than pellet proteins (1.04 g) ($p < 0.05$). According to the results, the 10% sample of grape-pomegranate co-precipitated proteins showed the highest viscosity among the other samples (1.15-15.26 cm).The results of the electrophoretic profile indicated that the grape-pomegranate seeds proteins could be precipitated and separated into supernatants and pellets by using phosphate buffer (pH = 7) and ammonium sulfate salt (%55). These compounds can be used for fortification of products such as soups, doughs, bakery products and more.

Keywords: Protein Co-Precipitates, Functional properties, Grape seed, Pomegranate seed.

[*] Corresponding author :m.ghorbani@gau.ac.ir.