

بررسی اثر تغییرات pH بر خواص عملکردی ایزوله پروتئین شنبليله

سمیرا فیضی^۱، مهدی وریدی^{۲*}، فاطمه زارع^۳، محمد جواد وریدی^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۲/۱۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۶/۱۵

چکیده

در این پژوهش ترکیب شیمیایی، پارامترهای رنگ و اثر تغییر pH بر ویژگی‌های عملکردی ایزوله پروتئین دانه شنبليله مورد بررسی قرار گرفت. ایزوله پروتئین شنبليله حاصل دارای ۸۹/۱٪ پروتئین، ۶/۰۰٪ چربی و ۳/۰۰٪ کربوهیدرات بر مبنای وزن خشک بود. رفتار محلول ۵٪ ایزوله پروتئین شنبليله سودوپلاستیک (شل‌شونده با برش) مشاهده شد. تغییر pH بر میزان حلالیت، ظرفیت کف‌کنندگی و پایداری آن و ظرفیت امولسیون‌کنندگی و پایداری آن تاثیرگذار بود. کمترین میزان حلالیت در pH برابر ۴/۵ دریافت شد که مؤید نقطه ایزوالکتریک ایزوله پروتئین شنبليله بود. همچنین، کمترین میزان ظرفیت ایجاد کف و امولسیون ایزوله پروتئین شنبليله نیز در pH ایزوالکتریک آن مشاهده شد. بیشترین ظرفیت ایجاد کف (۱۳۶٪) و امولسیون (۳۹٪) به ترتیب در pH‌های برابر ۸ و ۳ حاصل شد. میزان جذب آب و روغن در ایزوله پروتئین شنبليله به ترتیب ۲/۷ و ۶/۶ میلی‌لیتر به‌زای هر گرم ایزوله پروتئین و میزان پروتئین کوآگوله آن ۳/۷۷٪ بود.

واژه‌های کلیدی: ایزوله پروتئین دانه شنبليله، پارامتر رنگ، ویژگی‌های عملکردی، ویسکوزیته، pH.

مقدمه

(2007). شنبليله متعلق به خانواده فاباسه^۶ است و محل اصلی کشت آن کشورهای جنوب غرب آسیا، هند، جنوب شرق آفریقا و اطراف دریای مدیترانه می‌باشد (Idouraine, 1993; Srinivasan, 2007; Leela & Shafeekh, 2008). دانه شنبليله حاوی ۲۵ تا ۳۸/۶ درصد پروتئین است (Idouraine, 1993; Rao et al., 1996; Leela & Shafeekh, 2008). حدود ۵۳/۹ درصد از اسیدهای آمینه تشکیل‌دهنده پروتئین دانه شنبليله، اسیدهای آمینه ضروری می‌باشند که این میزان در مقایسه با لوبیا (۵۲ درصد)، گندم (۴۹/۲۵ درصد)، باقلا (۴۵/۳۱ درصد)، جو (۳۸/۷۹ درصد) و سورگوم (۳۷/۰۹ درصد) بیشترین مقدار است (El-Hawwary, 1988). از کل میزان پروتئین دانه شنبليله، حدود ۴۳/۸ درصد آن فراکسیون آلبومین، ۲۷/۲ درصد گلوبولین، ۱۷/۲ درصد گلووتین و ۰/۷ درصد پرولامین می‌باشد (Idouraine, 1993).

خواص عملکردی پروتئین‌ها گروهی از خواص هستند که تحت تاثیر عوامل مختلفی نظیر نوع منبع پروتئینی، فرآیند تولید آرد و یا ایزوله پروتئینی، همچنین نوع ترکیبات مرتبط با شبکه پروتئینی مثل لیپید، کربوهیدرات و هرگونه عامل فیزیکوشیمیایی همچون دما، غلظت نمک و pH می‌باشند. این عوامل در واقع به علت اثر بر آرایش ساختمانی و دنا تورا سیون پروتئین قابلیت تغییر و اثرگذاری بر خواص

امروزه پروتئین‌های گیاهی نقش مهمی در تغذیه مردم دارند، به‌ویژه در کشورهای در حال توسعه که متوسط میزان دریافت پروتئین آنها کمتر از حد نیاز طبیعی بدن می‌باشد (Arogundade et al., 2006; Kanu et al., 2007). به علت کمبود منابع پروتئین حیوانی، تلاشی بی‌وقفه در جهت یافتن منابع جدید پروتئینی و برخوردار از هر دو ویژگی خواص عملکردی و ارزش تغذیه‌ای آنها صورت می‌گیرد (Kanu et al., 2007). همچنین مصرف پروتئین‌های گیاهی به لحاظ اقتصادی با صرفه‌تر از پروتئین حیوانی می‌باشد (Arogundade et al., 2006). در سال‌های اخیر، بقولات به علت ارزش غذایی و ویژگی‌های عملکردی مناسب همراه با قیمت کم و تنوع زیاد، نقش مهمی به عنوان یک منبع پروتئینی ایفا می‌کنند (Khalil & Sarkadi, 2007; El Nasri & El Tinay, 1991).

از میان بقولات، دانه شنبليله^۵ به‌علت درصد پروتئین و ارزش غذایی بالای آن مورد توجه می‌باشد (El Nasri & El Tinay, 2007).

۱، ۲، ۴- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، استادیار و دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران.

۳- محقق مرکز تحقیقات کشاورزی و صنایع غذایی کانادا، مونترال، کانادا.

*- نویسنده مسئول: (Email: m.varidi@um.ac.ir)

نمکی کلرید سدیم ۰/۳۳ مولار با نسبت ۱:۲۰ وزنی/حجمی حل شد. سپس به منظور انحلال پروتئین، با سود ۱ مولار pH معادل ۹/۲۵ تنظیم گردید و در طول ۲ ساعت زمان هم‌زدن نیز کنترل pH انجام شد. پس از اتمام زمان انحلال، مخلوط حاصل در ۴۵۰۰×g به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ (مدل ۵۴۳۰، شرکت اپندورف آلمان) شد تا بخش محلول شامل پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌ها جدا گردد. در مرحله بعد به منظور ترسیب پروتئین و جداسازی کربوهیدرات، pH با استفاده از اسید کلریدریک ۱ مولار در نقطه ایزوالکتریک معادل ۴/۵ تنظیم شد و مجدداً جهت جداسازی فاز رسوبی حاوی پروتئین یک مرحله دیگر سانتریفیوژ در ۴۵۰۰×g به مدت ۲۰ دقیقه اعمال گردید. پس از جداسازی فاز رویی حاوی کربوهیدرات و سایر مواد، برای حذف بهتر ناخالصی‌ها ۲ مرحله شستشو با آب مقطر با نسبت ۱ به ۵ وزنی/حجمی انجام شد و سپس یک مرحله دیگر سانتریفیوژ در ۴۵۰۰×g به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. مرحله نهایی شامل انحلال پروتئین در آب دیونیزه و خنثی‌سازی با سدیم هیدروکسید ۱ مولار تا رسیدن به pH معادل ۷ بود. نهایتاً ایزوله حاصل به کمک خشک کن انجمادی، خشک شد و تا زمان بررسی خواص عملکردی در یخچال نگهداری گردید.

تعیین ترکیب شیمیایی: ترکیب شیمیایی نمونه‌ها (آرد کامل، آرد چربی‌گیری شده و ایزوله پروتئین شنبلیله) با استفاده از روش‌های AOAC سال ۱۹۹۰ اندازه‌گیری شد. برای تعیین رطوبت از آن 105°C ، تعیین چربی از روش سوکسله، تعیین پروتئین از روش کدال ($N \times 6/25$)، تعیین خاکستر از کوره 550°C استفاده گردید (AOAC, 1990). محاسبه میزان کربوهیدرات نیز از طریق کسر درصد کلیه ترکیبات از ۱۰۰ انجام شد. کلیه آزمون‌ها با دو تکرار انجام گرفتند.

بررسی پارامترهای رنگ: برای تعیین پارامترهای رنگ (L^* ،

a^* و b^*) نمونه‌های آرد شنبلیله قبل و بعد از چربی‌گیری و همچنین ایزوله پروتئین شنبلیله از رنگ‌سنج دیجیتال (مدل CR-410، شرکت کونیتا مینولتا سنسینگ ژاپن) استفاده شد. از یک پلیت پلاستیکی با قطر ۵۸ میلی‌متر و عمق ۱۵ میلی‌متر برای قرار دادن نمونه و اندازه‌گیری پارامترهای رنگ استفاده گردید. کالیبراسیون اولیه دستگاه از طریق کاشی استاندارد سفید صورت گرفت.

حلالیت پروتئین: بررسی میزان حلالیت پروتئین در pH‌های معادل ۲، ۳، ۴/۵، ۶، ۸ و ۱۰ با استفاده از روش بیورت انجام گرفت (Owusu-Apente, 2002). همچنین آماده‌سازی محلول پروتئینی بر اساس روش Bera و Mukherjee (۱۹۸۹) همراه با برخی اصلاحات بود. برای این منظور محلول ۱/۵٪ پروتئین در آب دیونیزه تهیه گردید. سپس تنظیم pH به کمک اسید کلریدریک و یا هیدروکسید سدیم ۰/۵ مولار صورت گرفت و پس از تنظیم pH

عملکردی آن را نیز دارند (Oshodi & Ojokan, 1997; Arogundade et al., 2004; Arogundade, 2006). وجود هر دو بخش آبدوست و چربی‌دوست در زنجیره پلیمری پروتئین باعث ایجاد و تسهیل قابلیت اتصال پروتئین با آب و چربی می‌گردد، این ویژگی در پروتئین کاملاً وابسته به ساختار آن است و ساختار پروتئین نیز تحت تأثیر pH و عوامل گفته شده می‌باشد. بنابراین هرگونه تغییر در این عوامل سبب تغییر در خواص عملکردی پروتئین می‌شود (Aluko & Yada, 1995).

ویژگی‌های عملکردی پروتئین‌ها بر اساس مکانسیم عمل به سه گروه عمده تقسیم می‌شوند:

(۱) ویژگی‌های مربوط به آبیگری پروتئین‌ها، شامل جذب آب، روغن، حلالیت، قوام دهنده‌گی و قابلیت خیس شدن.

(۲) خواص مربوط به ساختار پروتئینی و ویژگی‌های رئولوژیکی شامل ویسکوزیته، انعقاد و تشکیل ژل.

(۳) ویژگی‌های مربوط به خواص سطحی پروتئین‌ها شامل امولسیون‌کنندگی، کف‌زایی و قابلیت هم‌زدن.

به‌طور کلی هدف از این پژوهش بررسی اثر تغییر pH بر خواص عملکردی مختلف ایزوله پروتئین شنبلیله نظیر حلالیت، ظرفیت کف‌کنندگی و پایداری کف، ظرفیت امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون و همچنین بررسی پارامترهای رنگ، ویسکوزیته و ظرفیت جذب آب و روغن آن می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد

دانه شنبلیله از اصفهان تهیه شد. کلیه حلال‌ها و مواد شیمیایی با درجه تجزیه‌ای شامل حلال هگزان برای چربی‌گیری از آرد، هیدروکسید سدیم، اسید کلریدریک، کلرید سدیم، اسید سیتریک، اسید فسفریک و سرم آلبومین گاوی^۱ از شرکت‌های مرک و سیگما تهیه شدند.

روش‌ها

تهیه آرد از دانه: دانه شنبلیله پس از تهیه تمیز شده و مواد زائد و خارجی آن حذف شدند. سپس توسط آسیاب به آرد تبدیل و از الک با مش ۳۰ عبور داده شد. آرد کامل حاصل به مدت ۳ ساعت با حلال هگزان، با نسبت ۱ به ۴ چربی‌گیری و مجدداً از الک با مش ۴۰ عبور داده شد. آرد چربی‌گیری شده تا مرحله استخراج پروتئین در دمای یخچال (4°C) نگهداری شد.

تهیه ایزوله پروتئین: تهیه ایزوله پروتئین با روش Feyzi و همکاران (۲۰۱۵) صورت گرفت. آرد چربی‌گیری شده در محلول

1 Bovine serum albumin (BSA)

روش زیر محاسبه گردید:

$$(2) \quad 100 \times (A_1 - A_2) / A_1 = \text{درصد پروتئین کوآگوله}$$

تعیین ظرفیت کف‌کنندگی و پایداری کف: برای تعیین ظرفیت کف‌کنندگی محلول ۲٪ ایزوله پروتئین در آب مقطر تهیه گردید، سپس با استفاده از اسیدکلریدریک و یا هیدروکسیدسدیم ۰/۵ مولار، pH در مقادیر ۲، ۳، ۴/۵، ۶، ۸ و ۱۰ تنظیم شد. محلول پروتئینی در pH مورد نظر به مدت ۵ دقیقه به آرامی بر روی همزن مغناطیسی هم‌زده و سپس به فالكون یا استوانه مدرج منتقل گردید، حجم محلول قبل از هم‌زدن ثبت گردید (V_0). سپس محلول به مدت ۲ دقیقه با دستگاه اولتراتوراکس (مدل تی ۲۵ دیجیتال، شرکت آی کی ای آلمان) با دور ۱۰۰۰۰rpm هم‌زده شد و مجدداً بلافاصله پس از هم‌خوردن حجم محلول ثبت شد (V_1) (Coffman & Garcia, 1997). میزان ظرفیت کف‌کنندگی به صورت زیر محاسبه گردید:

$$(3) \quad 100 \times (V_1 - V_0) / V_0 = \text{ظرفیت کف‌کنندگی (درصد)}$$

همچنین پایداری کف در زمان‌های ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه پس از مخلوط کردن، به صورت میزان کاهش حجم کف بررسی شد. برای این منظور حجم محلول در زمان مورد نظر (V_2) ثبت گردید و پایداری کف به طریق زیر محاسبه شد:

$$(4) \quad 100 \times (V_2 - V_0) / (V_1 - V_0) = \text{پایداری کف (درصد)}$$

ظرفیت امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون: بررسی ظرفیت امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون به روش Neto و همکاران (۲۰۰۱) همراه با اصلاحات انجام شد. برای این منظور محلول ۱ درصد ایزوله پروتئین شنبلیله در آب تهیه گردید. سپس pH در مقادیر ۲، ۳، ۴/۵، ۶، ۸ و ۱۰ با استفاده از اسید کلریدریک و یا سود ۰/۵ مولار تنظیم شد. پس از آن روغن آفتابگردان به محلول اضافه گردید و مخلوط حاصل ۲/۵ دقیقه روی همزن مغناطیسی به آرامی و سپس ۲/۵ دقیقه با استفاده از دستگاه اولتراتوراکس (مدل تی ۲۵ دیجیتال، شرکت آی کی ای آلمان) با دور ۵۰۰۰rpm هم‌زده شد (H_0). امولسیون حاصل به مدت ۲ دقیقه در $1000 \times g$ سانتریفیوژ گردید و ارتفاع لایه امولسیون شده بعد از سانتریفیوژ اندازه‌گیری شد (H_1). ظرفیت امولسیون‌کنندگی با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید:

$$(5) \quad 100 \times H_1 / H_0 = \text{ظرفیت امولسیون‌کنندگی (درصد)}$$

به منظور بررسی پایداری امولسیون، نمونه‌ها دقیقاً قبل از سانتریفیوژ به مدت ۳۰ دقیقه در بن‌ماری $80^\circ C$ قرار گرفت به این طریق پایداری امولسیون در هر pH در زمان‌های ۰، ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه بررسی و اندازه‌گیری شد (H_2).

$$(6) \quad 100 \times H_2 / H_1 = \text{ظرفیت امولسیون‌کنندگی (درصد)}$$

تجزیه و تحلیل داده‌ها: کلیه آزمون‌ها در دو تکرار انجام گرفتند. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از طرح کاملاً

محلول پروتئینی به مدت ۳۰ دقیقه به کمک همزن مغناطیسی، در دمای اتاق هم‌زده شد. سپس به منظور جداسازی فاز معلق، نمونه‌ها در $5000 \times g$ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. میزان پروتئین موجود در فاز رویی، از طریق مخلوط کردن فاز رویی با معرف بیورت و سپس ۲۰ دقیقه قرار دادن در دمای اتاق، با استفاده از روش بیورت و به کمک اسپکتروفوتومتر (مدل یو وی ۲۶۰۱، شرکت رای لی چین) تعیین گردید. کلیه جذب‌ها در طول موج 540 nm نانومتر خوانده شد. برای رسم منحنی کالیبراسیون از محلول سرم آلومین گاوی، در غلظت‌های صفر تا ۱۰ (میلی‌گرم / میلی‌لیتر) در معرف بیورت استفاده گردید.

ظرفیت جذب آب و روغن: اندازه‌گیری ظرفیت جذب آب و روغن ایزوله پروتئین بر اساس روش Beuchat (۱۹۷۷) انجام گرفت. یک گرم (W) ایزوله پروتئین داخل یک لوله سانتریفیوژ ریخته شد. سپس ۱۰ میلی لیتر (V_0) روغن آفتابگردان یا آب مقطر به ایزوله اضافه گردید و با استفاده از ورتکس (هایدولف ریکس کنترل، آلمان)، به مدت ۲ دقیقه مخلوط شد. پس از این مرحله نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند و در مرحله بعد به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت $3000 \times g$ سانتریفیوژ شدند و فاز رویی (V_1) (آب یا روغن) جدا شد. ظرفیت جذب آب و روغن به صورت حجم آب یا روغن جذب شده (میلی‌لیتر) توسط هر گرم ایزوله پروتئین، از طریق رابطه زیر محاسبه گردید:

$$(1) \quad (V_0 - V_1) / W = \text{ظرفیت جذب آب (روغن)}$$

ویسکوزیته: ویسکوزیته ایزوله پروتئین شنبلیله براساس روش Chakraborty (۱۹۸۶) همراه با اصلاحات اندازه‌گیری شد. محلول ۰/۵٪ ایزوله پروتئین در آب مقطر تهیه شد. محلول حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق با کمک همزن مغناطیسی هم‌زده شد. ویسکوزیته محلول ایزوله پروتئین شنبلیله با استفاده از رئومتر بروکفیلد (ال وی دی وی-III- اولترا، آمریکا) به کمک اسپیندل ULA در دمای اتاق اندازه‌گیری شد.

درصد پروتئین کوآگوله: به منظور محاسبه درصد پروتئین کوآگوله از روش Kramer و Kwee (۱۹۷۷) استفاده شد. برای این منظور ۰/۲ گرم از نمونه ایزوله پروتئین شنبلیله در ۱۰ میلی‌لیتر از محلول بافر فسفات سیترات ۰/۰۲۵ مولار (pH معادل ۷) حل شد. محلول حاصل به مدت ۵ دقیقه هم‌زده شد، سپس به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ 3500 rpm شد. فاز رویی محلول سانتریفیوژ شده با معرف بیورت مخلوط و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. باقیمانده فاز رویی به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب گرم $100^\circ C$ نگهداری شد و بلافاصله تا دمای اتاق سرد شده و مشابه نمونه اول با معرف بیورت ترکیب و ۲۰ دقیقه نگهداری شد. جذب هر دو نمونه قبل از اعمال حرارت (A_1) و پس از اعمال حرارت (A_2) در طول موج 540 nm با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (مدل یو وی ۲۶۰۱، شرکت رای لی چین) خوانده شد. درصد پروتئین کوآگوله مطابق با

میزان روغن دانه شنبلیله مورد استفاده در این پژوهش ۵/۷۶٪ و مشابه با نتایج گزارش شده توسط Patil و همکاران (۱۹۹۷، ۵/۸٪) بود ولی کمتر از میزان روغن محاسبه شده (۷/۱۴٪) توسط El Nasri و El Tinay (۲۰۰۷) برآورد شد. همچنین بر اساس نتایج آنالیز واریانس بین میزان چربی آرد کامل و ایزوله پروتئین اختلاف آماری معناداری ($P < 0/05$) مشاهده نشد، این در حالیست که میزان چربی آرد بعد از چربی‌گیری ۱/۲۵٪ بود.

علت این امر را می‌توان به کمتر بودن درصد رطوبت ایزوله پروتئین شنبلیله نسبت به آرد و همچنین کاهش قابل توجه ترکیبات کربوهیدراتی در حین فرآیند استخراج پروتئین و رسانیدن مقدار آنها از ۴۷/۳۵٪ در آرد بعد از چربی‌گیری به ۴/۳۳٪ در ایزوله نسبت داد. متوسط میزان ترکیبات کربوهیدراتی در دانه شنبلیله بالا بود. بخش عمده پوسته و اندوسپرم دانه شنبلیله حاوی صمغ گالاتومانان (۳۶ درصد) است (Sauvaire, 1984).

میزان خاکستر آرد کامل شنبلیله ۵/۱۷٪ و بیشتر از مقدار گزارش شده (۳/۳٪) توسط El Tinay و El Nasri (۲۰۰۷) برای دانه کامل شنبلیله بود. این اختلاف را می‌توان به بیشتر بودن میزان املاح، همچنین درصد پروتئین و در نتیجه ازت دانه شنبلیله بومی ایران به علت اختلاف در شرایط کاشت و نوع خاک نسبت داد.

به علاوه همان‌طور که مشاهده می‌گردد میزان خاکستر و کربوهیدرات آرد چربی‌گیری شده کمتر از آرد کامل می‌باشد، علت این امر حذف بخشی از پوسته و اندوسپرم به‌عنوان جزء سنگین آرد، در مرحله حذف حلال چربی‌گیری از آرد می‌باشد، پوسته و اندوسپرم حاوی بخش عمده‌ای از ترکیبات کربوهیدراتی بویژه صمغ گالاتومانان هستند، همچنین بخش عمده خاکستر دانه‌ها در پوسته آنها وجود دارد.

تصادفی و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح معنی‌داری $p < 0/05$ صورت گرفت. نتایج به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۶) آنالیز و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار اکسل ۲۰۰۷ استفاده شد.

نتایج و بحث

تعیین ترکیب شیمیایی

همان‌طور که در جدول ۱ ملاحظه می‌شود میزان پروتئین ایزوله پروتئین شنبلیله در مقایسه با آردها بیشتر می‌باشد (۸۹/۱٪). بر اساس منابع موجود، این میزان در مقایسه با سایر ایزوله‌های تولیدی، بعد از ایزوله پروتئین تولیدی توسط El-Hawwary (۱۹۸۸) به روش قلیایی با ۹۱٪ پروتئین، بیشتر بود. Sauvaire و همکاران (۱۹۸۴) از دو واریته دانه شنبلیله با ۳۰/۸ و ۲۸/۲٪ پروتئین، به کمک روش استخراج با محلول هیدروکسید سدیم، به ایزوله‌هایی به ترتیب با ۷۶/۳٪ و ۷۲٪ پروتئین دست یافتند. Abdel-Aal و همکاران (۱۹۸۶) از دانه شنبلیله با ۳۰/۶۶٪ پروتئین به سه روش ایزوله پروتئین تهیه نمودند. آنها در روش تولید ایزوله با محلول سدیم هیدروکسید به ۶۰/۳۷٪، در روش استفاده از محلول نمکی کلرید سدیم به ۵۹/۳٪ و در روش هیدرولیز آنزیمی به ۶۲/۴٪ پروتئین دست یافتند. Sarkadi و Khalil (۱۹۹۱) به روش استخراج قلیایی با هیدروکسید سدیم ۰/۱ مولار ایزوله با ۸۲٪ پروتئین تولید کردند. El Tinay و El Nasri (۲۰۰۷) از دانه شنبلیله با ۲۸/۴٪ پروتئین، با استفاده از محلول نمکی کلرید سدیم ایزوله با ۷۳/۹٪ پروتئین تولید نمودند. میزان پروتئین دانه شنبلیله مورد استفاده که بومی ایران است در مقایسه با دانه شنبلیله که در سایر پژوهش‌ها استفاده شده و همچنین بسیاری از بقولات دیگر بیشتر می‌باشد (El Nasri & El Tinay, 2007).

جدول ۱- آنالیز پارامترهای رنگ و ترکیب شیمیایی آرد و ایزوله پروتئین شنبلیله برحسب درصد وزنی - وزنی

نمونه / پارامتر	آرد کامل	آرد فاقد چربی	ایزوله پروتئین
رطوبت (%)	۷/۳۳±۰/۰۹ ^{a*}	۶/۶۷±۰/۱۸ ^b	۵/۳۰±۰/۱۹ ^c
پروتئین (%)	۳۴/۷۰±۰/۱۴ ^{c***}	۵۱/۴۰±۰/۱۷ ^b	۸۹/۱۰±۰/۶۰ ^a
چربی (%)	۵/۷۶±۰/۰۸ ^a	۱/۲۵±۰/۲۵ ^b	۶/۰۰±۰/۵۶ ^a
کربوهیدرات (%)	۵۴/۷۵±۰/۰۶ ^a	۴۳/۵۶±۰/۲۹ ^b	۳/۰۰±۰/۰۶ ^c
خاکستر (%)	۴/۷۹±۰/۱۳ ^{ab}	۳/۷۹±۰/۱۰ ^{abc}	۱/۹۰±۰/۲۰ ^{bc}
L*	۷۸/۹۱±۰/۱۵ ^b	۸۹/۳۵±۰/۳۵ ^a	۸۰/۲۷±۰/۵۳ ^b
a*	-۱/۰۷±۰/۳۸ ^b	-۳/۳۹±۰/۰۷ ^c	-۰/۱۹±۰/۲۶ ^a
b*	۲۹/۸۳±۰/۸۰ ^a	۲۴/۴۷±۰/۴۱ ^b	۲۵/۶۰±۰/۰۹ ^b

*میانگین ۲ تکرار ± انحراف استاندارد.

**نتایج در هر سطر که دارای حروف غیرمشابه می‌باشند، از نظر آماری دارای اختلاف آماری معنی‌دار ($P < 0/05$) هستند

پارامترهای رنگ

یک پارامتر مهم در مورد آرد و فرآورده‌های پروتئینی نظیر کنسانتره و ایزوله پروتئینی رنگ آنها می‌باشد. پارامتر L^* نشان‌دهنده درجه روشنی می‌باشد و مقادیر ۰ تا ۱۰۰ را می‌تواند به خود اختصاص دهد، هر قدر میزان L^* بیشتر باشد نشان‌دهنده روشن‌تر بودن رنگ است (Wrostad *et al.*, 2010). همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود بین پارامتر L^* آرد سنبله قبل و بعد از چربی‌گیری اختلاف آماری معنی‌دار ($P < 0.05$) وجود داشت که علت آن را می‌توان حذف پوسته و اندوسپرم آرد سنبله، در مرحله حذف حلال چربی‌گیری از آرد دانست. بخش عمده خاکستر و رنگدانه‌ها در فاز پوسته دانه‌ها موجود می‌باشد که با حذف این بخش رنگ آرد روشن‌تر می‌گردد.

پارامتر a^* از مقادیر منفی (نشان‌دهنده رنگ سبز) تا مقادیر مثبت (نشان‌دهنده رنگ قرمز) و پارامتر b^* نیز از مقادیر منفی (رنگ آبی) تا مقادیر مثبت (رنگ زرد) می‌باشند (Wrostad *et al.*, 2010). در مورد آرد سنبله اختلاف آماری معنی‌دار ($P < 0.05$) بین پارامتر a^* و b^* قبل و بعد چربی‌گیری وجود داشت. دلیل این امر را نیز می‌توان جداسازی فاز پوسته دانست، فاز پوسته رنگ زرد مایل به قهوه‌ای دارد که به لحاظ طیف رنگی تا حدی به قرمز نزدیک است، بنابراین حذف فاز پوسته باعث می‌گردد که رنگ سبز طبیعی بخش‌های داخلی دانه بیشتر مشخص گردد. همچنین بین پارامتر a^* و b^* ایزوله پروتئین سنبله با دو نمونه آرد نیز اختلاف آماری معنی‌دار ($P < 0.05$) وجود داشت به طوری که در مقایسه با نمونه‌های آرد سنبله چربی‌گیری شده، پارامتر a^* آن به سمت طیف قرمز و b^* آن کمی به سمت طیف زرد متمایل گردیده است. این امر را می‌توان به تاثیر فرآیند استخراج پروتئین و همچنین مرحله خشک کردن بر پارامترهای رنگ نسبت داد. هر چند که خشک کن انجمادی بهترین قابلیت حفظ رنگ طبیعی آرد را در ایزوله پروتئین نهایی در مقایسه با خشک‌کن‌هایی نظیر آون خلا و پاششی به دلیل ممانعت از وقوع واکنش‌های ناشی از دمای بالا نظیر میلارد، دارد (Amza *et al.*, 2011).

حلالیت پروتئین

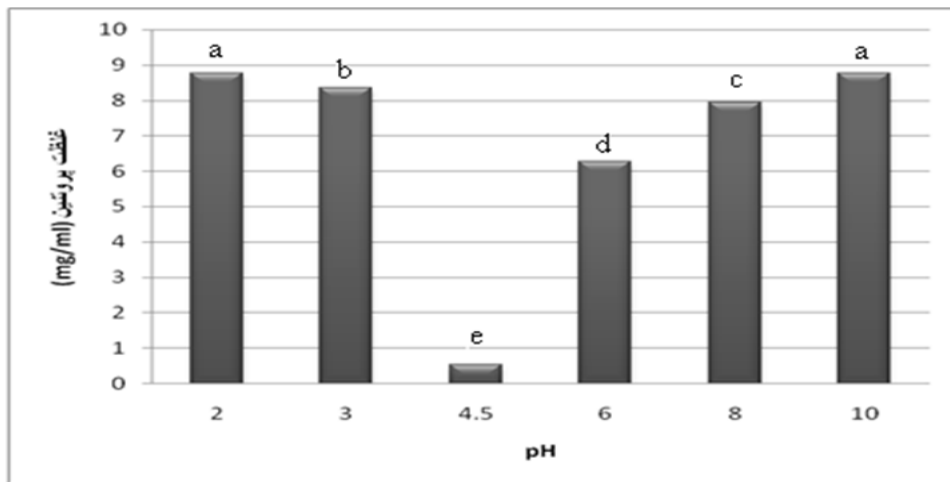
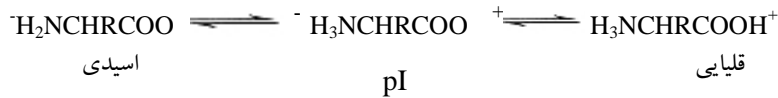
حلالیت پروتئین به‌عنوان اولین شاخص اندازه‌گیری ویژگی‌های عملکردی پروتئین‌ها مطرح می‌باشد. در بین ویژگی‌های عملکردی مختلف، حلالیت پروتئین در شرایط مختلف از اهمیتی ویژه برخوردار است. دلیل این اهمیت، تاثیرگذاری حلالیت بر سایر خواص نظیر امولسیفیکاسیون، کف‌زایی و ژلاتیناسیون می‌باشد. از طریق این اثرگذاری، پروتئین می‌تواند ویژگی‌های قابل توجه دیگری همانند

ایجاد طعم، عطر و بافت مطلوب و ارزش غذایی را به‌همراه داشته باشد (Kinsella, 1982).

همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود حلالیت پروتئین کاملاً تحت تاثیر pH قرار دارد. داده‌های این نمودار سه ناحیه را برای حلالیت پروتئین در ایزوله پروتئین سنبله نشان می‌دهند: حلالیت در ناحیه اسیدی، نزدیک به pH ایزوالکتریک (pI) و در ناحیه قلیایی. کمترین میزان حلالیت پروتئین در pI معادل ۴/۵ بود، این یافته مشابه نتایج بیان شده توسط Abdel-Aal و همکاران (۱۹۸۶)، El-Hawary (۱۹۸۸) و همچنین El Tinay و El Nasri (۲۰۰۷) می‌باشد. علت این پدیده را می‌توان به صفر بودن برآیند بار الکتریکی در pI و تعادل بین بارالکتریکی مثبت و منفی و در نتیجه کاهش نیروهای دافعه نسبت داد. مجموع این دلایل باعث کاهش حلالیت پروتئین می‌گردد. در pHهای قلیایی و اسیدی به ترتیب به دلیل افزایش بار منفی ناشی از گروه‌های کربوکسیل و بار مثبت ناشی از گروه‌های آمین، نیروهای نیروهای دافعه الکتروستاتیک بین اسیدهای آمینه با بارهای هم‌نام افزایش یافته و در نتیجه حلالیت بیشتر می‌شود. به جز pHهای ۲ و ۱۰ که بین میزان حلالیت آنها تفاوت آماری معنی‌دار ($P < 0.05$) وجود نداشت، در مورد سایر pHها با تغییر pH، میزان حلالیت پروتئین به‌صورتی معنی‌دار تغییر کرد.

ظرفیت جذب آب و روغن

ظرفیت جذب آب در مواد غذایی مختلف به ترکیب اسیدهای آمینه، آرایش فضایی پروتئین، میزان آبدوستی و آب‌گریزی پروتئین و همچنین حضور کربوهیدرات‌های آبدوست بستگی دارد (Sikorski, 2002; Seena & Sridhar, 2005)، به‌علاوه وجود فیبر خام نیز به‌عنوان عاملی در نظر گرفته می‌شود که بر جذب آب موثر است (Ragab *et al.*, 2004). پارامتر قابل توجه دیگر میزان چربی در نمونه است به طوری که با افزایش مقدار چربی قابلیت جذب آب کاهش می‌یابد. Singh و Kaur (۲۰۰۵) نیز با بررسی ایزوله‌های پروتئینی نخود نتایج مشابهی به‌دست آوردند به طوری که با افزایش میزان چربی، ظرفیت جذب آب کاهش یافت. همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، ظرفیت جذب آب ایزوله پروتئین سنبله در این پژوهش به‌طور متوسط ۲/۷ میلی‌لیتر به‌ازای هر گرم ایزوله بود. این میزان در مقایسه با نتایج گزارش شده (۱/۶۸ میلی‌لیتر/گرم) برای ایزوله پروتئین سنبله توسط El Nasri و El Tinay (۲۰۰۷)، و همچنین ایزوله پروتئین تجاری سووا (۲/۲۴ گرم/گرم) توسط Amza و همکاران (۲۰۱۱) بیشتر می‌باشد ولی در مقایسه با مقدار اعلام شده (۳/۵۲ میلی‌لیتر/گرم) توسط Abdel-Aal و همکاران (۱۹۸۶) که از دانه سنبله با ۳۵/۸٪ پروتئین ایزوله تهیه کرده‌اند؛ کمتر می‌باشد.



شکل ۱- حلالیت ایزوله پروتئین شنبلیله در مقادیر مختلف pH

* نتایج با حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف آماری معنی‌دار هستند ($P < 0.05$)

جدول ۲- خواص عملکردی ایزوله پروتئین شنبلیله

ویسکوزیته (سانتی‌پواز)	ظرفیت جذب روغن (میلی لیتر/گرم)	ظرفیت جذب آب (میلی لیتر/گرم)	پروتئین کواگوله (درصد)
۳۰ (۱/ثانیه) ۵۰	۱۵	۶/۶ ± ۰/۲۸	۳/۷۷ ± ۰/۱*
۷۸۷/۵	۹۲۲/۵	۱۱۵۰	۲/۷ ± ۰/۱۴

* میانگین ۲ تکرار ± انحراف استاندارد.

آمده برای جذب روغن پیشنهاد می‌کنند (Kaur & Singh, 2007). همچنین، Adebowale و همکاران (۲۰۰۴) به این نتیجه رسیدند که هر چه اسیدهای آمینه غیر قطبی در زنجیره جانبی پروتئین‌ها بیشتر باشد، ظرفیت جذب روغن نیز بیشتر خواهد بود.

نتایج حاصل نشان‌دهنده بالا بودن میزان قابلیت جذب روغن در ایزوله پروتئین شنبلیله می‌باشد. بالا بودن ظرفیت جذب روغن پارامتری مهم در قابلیت نگهداری عطر و طعم می‌باشد، در حالیکه قابلیت امولسیون‌کنندگی به حفظ و افزایش ایجاد و پایداری امولسیون‌ها کمک می‌کند (Kinsella, 1979).

نکته قابل توجه این است که بین خاصیت جذب روغن و ویژگی امولسیون‌کنندگی در پروتئین آرد و ایزوله‌های پروتئینی تفاوت وجود دارد. به بیان دیگر جذب روغن بیشتر یک پدیده‌ی فیزیکی است به‌طوریکه ترکیبات و بیوپلیمرهای موجود در نمونه آرد یا ایزوله پروتئینی باعث محبوس شدن و به دام افتادن قطرات روغن در داخل خود می‌شوند، درحالیکه ویژگی امولسیون‌کنندگی پدیده‌ی فیزیکی شیمیایی است و از طریق پیوندهای شیمیایی مختلف نظیر پیوند واندروالسی، یونی، قطبی-قطبی و غیره فاز روغن در فاز آب توسط

میزان قابلیت جذب آب در ایزوله پروتئین شنبلیله حاصل قابل توجه و مطلوب می‌باشد.

به‌طور کلی ظرفیت جذب و نگهداری آب ویژگی مهم در مورد مواد غذایی ویسکوز همانند سوپ‌ها، خمیرها و فرآورده‌های پخت می‌باشد زیرا در این محصولات بدون انحلال پروتئین به حبس و نگهداری آب نیاز است تا ویسکوزیته لازم تامین گردد (Adeyeye *et al.*, 1994; Seena & Sridhar, 2005). میزان قابلیت جذب روغن همان‌گونه که در جدول ۲ مشخص گردیده، در ایزوله پروتئین شنبلیله ۶/۶ میلی لیتر به‌ازای هر گرم ایزوله بود. این میزان از مقادیر گزارش شده (۱/۵۶ میلی لیتر/گرم) توسط El Nasri و El Tinay (۲۰۰۷)، در مورد ایزوله پروتئین شنبلیله، و ۱/۲۶ گرم/گرم در مورد ایزوله پروتئین سویا توسط Amza و همکاران (۲۰۱۱)، بیشتر می‌باشد. محققان بسیاری ظرفیت جذب روغن را محبوس کردن فیزیکی روغن عنوان نموده‌اند (Kinsella, 1982) و آن را به زنجیره‌های غیرقطبی پروتئین که ممکن است با زنجیره‌های جانبی هیدروکربنی روغن برهم‌کنش داشته‌باشند، و همچنین به شکل فضایی پروتئین نسبت می‌دهند. در نتیجه، اختلاف بین این عوامل در مواد غذایی مختلف را دلیل تفاوت در اعداد بدست

افزایش میزان پروتئین کوآگوله عمدتاً مربوط به فعالیت آنزیم‌های پروتئولیتیک می‌باشد که باعث شکست و تخریب مولکول‌های پروتئین و تبدیل آنها به واحدهای اسید آمینه می‌گردد (Walsh *et al.*, 2003). وقوع این پدیده باعث کاهش واکنش بین مولکول‌های پروتئین با معرف بیورت گردیده و در نتیجه کاهش ایجاد رنگ بنفش را به دنبال خواهد داشت.

پایین بودن میزان پروتئین کوآگوله و بالاتر بودن میزان حلالیت پروتئین خاصیتی است که در افزودنی‌های غذایی و نوشیدنی‌های صبحانه مطلوب می‌باشد (Kramer & Kwee, 1977).

ظرفیت کف‌کنندگی و پایداری کف

کف در مواد غذایی شامل پراکندگی حباب‌های گاز داخل یک فاز مایع و یا یک فاز نیمه جامد پیوسته است. خاصیت کف‌کنندگی معمولاً در ایجاد خصوصیات رئولوژیکی مطلوب در مواد غذایی نظیر بافت نان، کیک، خامه زده شده، بستنی نقش اساسی دارد. بنابراین پایداری کف به عنوان یک معیار مهم در کیفیت مواد غذایی ممکن است حائز اهمیت باشد (Oladele & Aina, 2007). پایداری سیستم توسط کاهش کشش بین سطح گاز-مایع و تشکیل لایه پروتئینی مقاوم در برابر پاره شدن با کشش پذیری (الاستیسیته) بالا در اطراف حباب‌ها و تغییر ویسکوزیته فاز مایع ایجاد می‌شود (Arema *et al.*, 2007).

همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌گردد ظرفیت کف‌کنندگی پارامتری است که کاملاً تحت تاثیر pH است. کمترین میزان قابلیت کف‌کنندگی (۳۱٪) در pI معادل ۴/۵ مشاهده شد، در این pH مولکول‌های پروتئینی در متراکم‌ترین حالت خود قرار دارند و انعطاف‌پذیری آنها در حداقل میزان خود می‌باشد. این نتیجه مشابه نتایج El Tinay و El Nasri (۲۰۰۷) می‌باشد، آنها قابلیت کف‌کنندگی ایزوله سنبليله در pI را برابر ۲۷/۵ اعلام کردند.

مهم‌ترین عامل که باعث می‌شود پروتئین در شرایط مختلف نظیر pHهای متفاوت به‌عنوان یک عامل کف‌زای مطلوب فعالیت کند، قابلیت جذب سریع آن در سطح بین آب-هوا و همچنین تغییرات ساختاری سریع در پروتئین در آن سطح می‌باشد (Fidantsi & Doxastakis, 2001). افزایش قابلیت کف‌کنندگی در pHهای قلیایی و اسیدی در مقایسه با pI را می‌توان به افزایش بار الکتریکی مولکول‌های پروتئین که سبب کاهش و تضعیف برهم‌کنش‌های هیدروفوبی بین مولکول‌های پروتئین و در نتیجه افزایش انعطاف‌پذیری آنها می‌شود، نسبت داد. مجموع این تغییرات باعث گسترش پذیری بهتر و سریع‌تر پروتئین‌ها در سطح بین آب-هوا می‌شود، بنابراین مولکول‌های پروتئین اطراف حباب‌های هوا را گرفته و تشکیل کف را بهبود می‌بخشند.

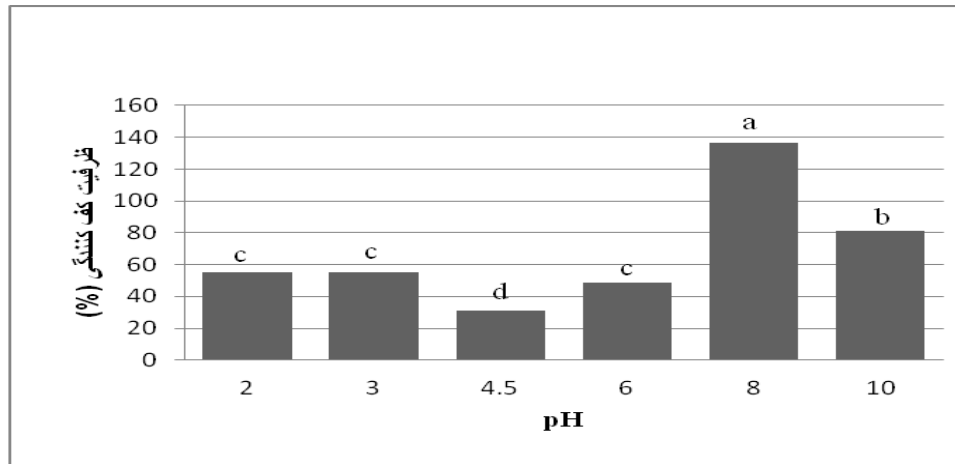
بیوپلیمرهای چربی دوست-آبدوست (اکثرأ پروتئین‌ها) درگیر می‌شود، بنابراین لزوماً ارتباطی مستقیم بین این دو ویژگی عملکردی وجود ندارد.

ویسکوزیته

یک پارامتر مهم در مواد غذایی که بر ویژگی‌های آن نظیر احساس دهانی و بافت اثر می‌گذارد ویسکوزیته آن می‌باشد. رفتار سیال در محدوده سرعت برش مورد بررسی با قانون توان برازش شد. ضریب همبستگی بالا (R^2) برابر ۰/۹۹۸۹ برای ایزوله پروتئین سنبليله کفایت مدل برازش یافته را نشان می‌دهد. در محدوده سرعت برشی مورد بررسی رفتار محلول ۵ درصد ایزوله پروتئین سنبليله سودوپلاستیک (شل شونده با برش) بود زیرا شاخص رفتار جریان (n) کوچک‌تر از یک و برابر ۰/۶۶۷ بود. علت این امر را می‌توان از بین رفتن برخی اتصالات بین زنجیره‌های پروتئینی و جدا شدن زنجیره‌ها از یکدیگر و همچنین منظم قرار گرفتن مولکول‌ها در جهتی که نیروی برشی اعمال می‌شود، دانست. اما ویسکوزیته ظاهری در کرنش (سرعت) برشی ۱۵ و ۳۰ و ۵۰ (۱/ثانیه) به ترتیب برابر ۰/۱۱۵، ۰/۹۲۲/۵ و ۰/۷۸۷/۵ سانتی‌پواز بود. این مقادیر از ویسکوزیته ظاهری گزارش شده در مورد ایزوله پروتئین کنجد در ماه‌های ۴۰ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد (Kanun *et al.*, 2007)، کنسانتره پروتئین کره بادام زمینی و ایزوله پروتئین سویا در محلول ۷/۵٪ قبل و بعد از حرارت‌دهی بیشتر است، ولی در مورد غلظت‌های ۱۰٪ و ۱۲/۵٪ کنسانتره پروتئین کره بادام‌زمینی و ایزوله پروتئین سویا در کرنش‌های برشی مختلف غالباً ویسکوزیته‌های بیشتری گزارش شده است (Yu *et al.*, 2007). به‌طور کلی ایزوله‌های پروتئینی با ویسکوزیته پایین در مورد محصولات نظیر آبمیوه‌ها، نوشیدنی‌ها با میزان پروتئین بالا و غذای نوزادان مناسب هستند (Kanun *et al.*, 2007)، در حالیکه ایزوله‌های پروتئینی با ویسکوزیته بالا در فرآورده‌های گوشتی نظیر سوسیس‌ها مطلوب می‌باشند (Yu *et al.*, 2007).

درصد پروتئین کوآگوله

پروتئین کوآگوله نشان‌دهنده میزانی از کل پروتئین محلول می‌باشد که پس از اعمال حرارت در ۱۰۰°C حلالیت خود را از دست می‌دهد. همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود این میزان درمورد ایزوله پروتئین سنبليله برابر ۳/۷۷٪ بود، که کمتر از مقادیر گزارش شده درمورد آرد مغزهای بادام درختی (۱۴/۳٪)، نارگیل (۱۱/۲٪)، فندق (۱۲/۶٪)، بادام زمینی (۱۳/۱٪) و گردو (۱۱/۸٪) توسط Awad-Allah (۲۰۱۳)، و همچنین کنسانتره‌های مختلف پروتئین تفاله گوجه‌فرنگی (۳۰/۶۴٪، ۳۳/۱۲٪، ۲۳/۷۸٪ و ۲۶/۷۸٪) گزارش شده توسط Kramer و Kwee (۱۹۷۷) می‌باشد.



شکل ۲- ظرفیت کف‌کنندگی ایزوله پروتئین شنبلیله در مقادیر مختلف pH

* نتایج با حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف آماری معنی‌دار هستند ($P < 0.05$)

جزء بیشترین مقادیر بود.

در زمان ۳۰ دقیقه فقط پایداری کف در pH معادل ۸ به‌طور معنی‌دار ($P < 0.05$) از pI کمتر بود. اما در سایر زمان‌ها به‌ترتیب pHهای ۲ و ۱۰ که دارای خاصیت هیدروفیلی بیشتری در مقایسه با سایر pHها بودند، کمترین خاصیت پایداری کف را داشتند. به‌طور کلی در تمامی زمان‌ها به‌ترتیب pHهای ۲، ۱۰ و سپس ۸ کمترین میزان پایداری را داشتند. pHهای ۳ و ۶ میزان پایداری بیشتری در مقایسه با سه pH دیگر داشتند.

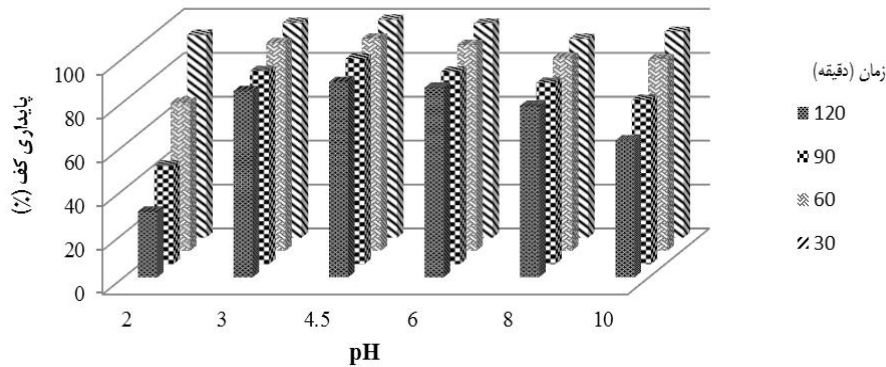
همان‌طور که ملاحظه می‌شود لزوماً بین قابلیت کف‌کنندگی و پایداری کف رابطه عکس وجود ندارد، زیرا در هر دو مورد وجود خاصیت هیدروفیل سطحی زیاد، نظیر آنچه در pHهای ۲ و ۱۰ مشاهده گردید، باعث کاهش خاصیت هیدروفوب سطحی و در نتیجه برهم‌کنش هیدروفوب-هیدروفوب می‌گردد. در صورتی که در فرآیند ایجاد کف به برهم‌کنش هیدروفوب-هیدروفوب بین پروتئین با هوا و در بحث پایداری کف به برهم‌کنش هیدروفوب-هیدروفوب بین مولکول‌های پروتئین جهت ایجاد لایه ویسکوز و پایدار نیاز می‌باشد.

ظرفیت امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون

همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، ظرفیت امولسیون‌کنندگی ایزوله پروتئین شنبلیله تابع تغییرات pH بود که این وابستگی به‌دلیل اثر pH بر تعادل هیدروفوب-هیدروفیل پروتئین می‌باشد. بیشترین ظرفیت امولسیون‌کنندگی در pH برابر ۳، به‌میزان ۳۹٪ حاصل شد. بنابراین ظرفیت ایجاد امولسیون در ایزوله پروتئین شنبلیله در pHهای اسیدی بیشتر می‌باشد. این یافته با نتایج بیان شده توسط Lawal (۲۰۰۴) مطابقت دارد، البته در مورد ایزوله لوبیای لوکاس هر دو محدوده اسیدی و قلیایی شدید باعث افزایش ظرفیت امولسیون‌کنندگی شده بودند.

منحنی تغییرات قابلیت کف‌کنندگی در برابر pH تقریباً مشابه منحنی حلالیت بود. علت این امر را می‌توان به تاثیر افزایش بارالکتریکی بر بهبود حلالیت و در نتیجه افزایش انعطاف‌پذیری پروتئین و نهایتاً بهبود گسترش‌پذیری در سطح آب-هوا نسبت داد. این یافته مشابه نتایج El Nasri و El Tinay (۲۰۰۷) و Lawal (۲۰۰۴) می‌باشد. اما برخلاف منحنی حلالیت که در pHهای ۲ و ۱۰ حلالیت بیشتر از pH برابر ۸ داشتند، بیشترین قابلیت کف‌کنندگی در pH برابر ۸ مشاهده شد. علت این امر را می‌توان افزایش بیش از اندازه خاصیت هیدروفیل سطحی در pHهای اسیدی و قلیایی شدید دانست که سبب تضعیف بیش از حد خاصیت هیدروفوب سطحی می‌گردد و در نتیجه اجازه برهم‌کنش مطلوب پروتئین با هوا که به‌عنوان فاز هیدروفوب در سیستم کف عمل می‌کند را نمی‌دهد.

قابلیت ایجاد کف پایدار به نوع پروتئین، دما، درجه دنا تورا سیون پروتئین، pH و روش مورد استفاده بستگی دارد (Kinsella, 1979). شکل ۳ وابستگی پایداری کف به pH را نشان می‌دهد. بر اساس نتایج آنالیز واریانس، بیشترین میزان پایداری کف در تمامی زمان‌ها مربوط به pH معادل ۴/۵ و کمترین مقدار پایداری در این pH مربوط به زمان ۱۲۰ دقیقه و برابر ۸۸٪ بود. علت این پدیده را می‌توان به صفر بودن برآیند بارالکتریکی در pI، کاهش نیروهای دافعه الکتروستاتیک و افزایش پایداری و استحکام برهم‌کنش‌های هیدروفوب-هیدروفوب بین مولکول‌های پروتئین و در نتیجه ایجاد یک لایه ویسکوز و پایدار اطراف حباب‌های هوا نسبت داد. این یافته مشابه نتایج Lawal (۲۰۰۴) در مورد ایزوله پروتئین لوبیای لوکاس می‌باشد، ولی با نتایج El Nasri و El Tinay (۲۰۰۷) متفاوت است. در پژوهش این محققین، ایزوله پروتئین شنبلیله در pHهای ۲ و ۱۰ پایداری بیشتری در مقایسه با pI داشت، هرچند که در پژوهش آنها میزان حلالیت و همچنین قابلیت ایجاد کف در دو pH گفته شده نیز



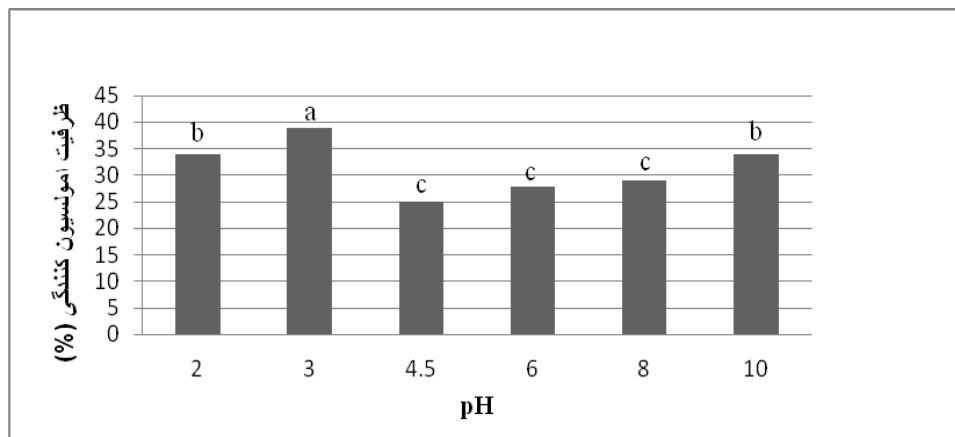
شکل ۳- اثر pH بر پایداری کف ایزوله پروتئین شنبلیله

($P < 0.05$) مشاهده نشد.

به طور کلی ظرفیت امولسیون کنندگی ایزوله پروتئین شنبلیله حاصل در مقایسه با ایزوله پروتئین لوبیای لوکاس (Lawal, 2004) کم بود. یک علت آن وجود مقادیر نسبتاً بالای روغن (۶/۶۶٪) در ایزوله می‌باشد که باعث اشباع شدن بخش قابل توجهی از ظرفیت امولسیون کنندگی شده و قابلیت پذیرش روغن اضافی را کاهش می‌دهد. به علاوه ایزوله شنبلیله حاصل حاوی مقدار نسبتاً قابل توجهی کربوهیدرات (۴/۲۳) بود که بر کاهش ظرفیت امولسیون کنندگی موثر می‌باشد (Adebowale & Lawal, 2004).

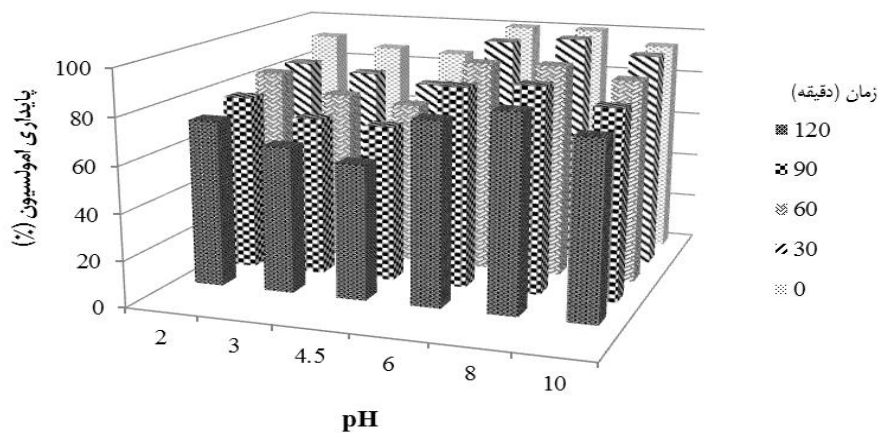
همان طور که در شکل ۵ مشاهده می‌گردد، با گذشت زمان میزان پایداری امولسیون کاهش یافت که ممکن است به علت افزایش تماس بین قطرات روغن و در نتیجه بهم پیوستن آنها در طول زمان باشد. بیشترین پایداری امولسیون در pH معادل ۸ مشاهده شد.

El Tinay و El Nasri (۲۰۰۷) در مورد ایزوله پروتئین شنبلیله به این نتیجه دست یافتند که pHهای قلیایی بالا - برابر ۱۲- اثر بیشتری بر افزایش قابلیت امولسیون کنندگی دارند. این تفاوت در یافته‌ها را می‌توان به تاثیر فرآیند تولید ایزوله و ترکیب پروتئین بر ظرفیت امولسیون کنندگی نسبت داد (Kiosseoglou *et al.*, 1999). همچنین عوامل دیگری نظیر نیتروژن محلول، بار خالص، کشش سطحی، شکل فضایی پروتئین، غلظت نمک و غلظت پروتئین نیز علاوه بر pH، بر تغییر قابلیت امولسیون کنندگی موثر می‌باشند (Lawal, 2004; Adebowale *et al.*, 2005). در pI کمترین میزان ظرفیت امولسیون کنندگی (۲۵٪) مشاهده شد که با نتایج El Tinay و El Nasri (۲۰۰۷، ۱۴/۶ میلی‌گرم/گرم) و Lawal (۲۰۰۴) منطبق می‌باشد. علت این امر کاهش حلالیت و انعطاف پذیری پروتئین در pI است. همچنین بین قابلیت امولسیون کنندگی در pHهای ۴/۵، ۶ و ۸ اختلاف معنی دار



شکل ۴- ظرفیت امولسیون کنندگی ایزوله پروتئین شنبلیله در مقادیر مختلف pH

نتایج با حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف آماری معنی دار هستند ($P < 0.05$)



شکل ۵- اثر مقادیر مختلف pH بر پایداری ایزوله پروتئین شنبلیله

نتیجه‌گیری

در این پژوهش اثر تغییرات pH بر ویژگی‌های عملکردی ایزوله پروتئین شنبلیله پرداخته شد. تغییر pH بر حلالیت پروتئین، قابلیت ایجاد کف و پایداری آن، قابلیت ایجاد امولسیون و پایداری امولسیون تأثیرگذار بود. کمترین میزان حلالیت، قابلیت تشکیل کف و امولسیون و بیشترین پایداری کف در نقطه ایزوالکتریک حاصل شد. بیشترین پایداری امولسیون در pH معادل ۸ مشاهده گردید. ایزوله حاصل به‌جز قابلیت تشکیل امولسیون از نظر سایر ویژگی‌های عملکردی به‌ویژه حلالیت، قابلیت ایجاد کف، پایداری کف و امولسیون و جذب روغن در مقایسه با سایر ایزوله‌های پروتئینی قابل توجه می‌باشد. همچنین مشخص شد محلول ایزوله پروتئین دانه شنبلیله دارای رفتار سودوپلاستیک می‌باشد.

در pHهای ۴/۵ و سپس ۳ کمترین میزان پایداری مشاهده شد. پایداری بالای امولسیون در pHهای قلبایی در مقایسه با pHهای اسیدی با نتایج Adebowale و Lawal (۲۰۰۴) و El Nasri و El اسیدی با نتایج Tinay (۲۰۰۷) مطابقت دارد. علت کاهش پایداری امولسیون در pI را می‌توان به ایجاد پیوندهای پایدار هیدروفوب-هیدروفوب بین مولکول‌های پروتئین و کاهش خاصیت هیدروفیلی و در نتیجه تضعیف برهم‌کنش با آب و از سویی دیگر غلبه احتمالی پیوند بین مولکول‌های پروتئین بر اتصالات پروتئین-روغن دانست. Lawal (۲۰۰۴) نیز دلیل کاهش پایداری امولسیون در pH ایزوالکتریک را کاهش نیروهای دافعه بین مولکول‌های پروتئین و در نتیجه افزایش تجمع و بهم‌پیوستگی بین آنها بیان کرده‌است.

منابع

- Abdel-Aal, E. M., Shehta, A. A., El-Mahdy, A. R., and Youssef, M. M. 1986. Extractability and functional properties of some legume proteins isolated by three different methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 37: 553-559.
- Adebowale, K. O. and Lawal, O. S. 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.
- Adebowale, Y. A., Adeyemi, I. A., & Oshodi, A. A. 2005. Functional and physicochemical properties of flours of six *Mucuna* species. *African Journal of Biotechnology*, 4: 1461-1468.
- Adeyeye, E. I., Oshodi, A. A., & Lpinmoroti, K. O. 1994. Functional properties of some varieties of African yam bean (*Sphenostylis stenocarpa*) flour II. *Food Chemistry*, 55: 450-459.
- Aluko, R. E., & Yada, R. Y. 1995. Structure-function relationship of cowpea (*Vigna unguiculata*) globulin isolate: influence of pH and NaCl on physicochemical and functional properties. *Food Chemistry*, 53: 259-265.
- Amza, T. Amadou, I. Zhu, K. and Zhou, H. 2011. Effect of extraction and isolation on physicochemical and functional properties of an underutilized seed protein: Gingerbread plum (*Neocarya macrophylla*). *Food Research International*, 44: 553 - 559.
- AOAC. Official method of analysis. (1990). Association of official analytical chemists (13th ed.). Washington, DC.
- Arema, M. O., O. Olaofe, et al. 2007. Functional properties of some Nigerian varieties of legume seed flours and flour

- concentration effect on foaming and gelation properties. *Journal of Food Technology* 5(2): 109-115.
- Arogundade, L. A. 2006. Functional characterization of Tef (Eragrosticstef) protein concentrate: Influence of altered chemical environment on its gelation, foaming, and water hydration properties. *Food Hydrocolloids*, 20: 831-838.
- Arogundade, L. A., Akinfenwa, M. O., & Salawu, A. A. 2004. Effect of NaCl and its partial or complete replacement with KCl on some functional properties of defatted *Colocynthis citrullus* L. seed flour. *Food Chemistry*, 84: 187-193.
- Arogundade, L. A., Tshay, M., Shumey, D., Manazie, S. 2006. Effect of ionic strength and/or pH on Extractability and physico-functional characterization of broad bean (*Vicia faba* L.) Protein concentrate. *Food Hydrocolloids*, 20: 1124-1134.
- Awad-Allah, A. A. 2013. Evaluation of Selected Nuts and Their Proteins Functional Properties. *Journal of Applied Science Research*, 9, 885- 896.
- Bera, M. B. Mukherjee, M. R. K. 1989, Solubility, emulsifying, and foaming properties of rice bran protein concentrates. *Journal of Food Science*.54: 142 – 145.
- Beuchat, L. R. 1977, Functional and electrophoretic characteristics of succinylated peanut flour proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 25: 258.
- Chakraborty, P. 1986. Coconut protein isolate by ultrafiltration. pp. 308-315. In LeMeguer & P. Jelen (Eds.). *Food Engineering and Process Applications*. New York: Elsevier Applied Science Publishers.
- Coffman, C. W., Garcia, V.V. 1977, Functional properties and amino acid content of protein isolate from mung bean flour. *Journal of Food Technology*, 12: 473-48.
- El-Hawwary, N. A. 1988. Relation between iso-electric point and soluble protein extracted from plant seeds at PH 10. *Agricultural Research Review*. 66: 433-439.
- El Nasri, N. A., El Tinay, A. H. 2007, Functional properties of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) protein concentrate. *Food Chemistry*, 103: 582-589.
- Feyzi, S., Varidi, M., Zare, F., and Varidi, M.J. 2015. Fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) seed protein isolate: extraction optimization, amino acid composition, thermo and functional properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, doi: 10.1002/jsfa.7056.
- Fidantsi, A., Doxastakis, G. 2001, Emulsifying and foaming properties of Amaranth seed protein isolate. *Journal of Colloids and Surfaces*, 21: 119-124.
- Idouraine, A. 1993. Isolation, characterization, functional properties and biological evaluation of tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) proteins. Bell & Howell Information. University of Arizona.
- Kanu, P. J., Kerui, Z., Ming, Z. H., Haifeng, Q., Kanu, J. B., and Kexue, Z. 2007, Sesame protein 11: Functional properties of sesame (*Sesamum indicum* L.) protein isolate as influenced by PH, temperature, time and ratio of flour to water during its production. *Asian Journal of Biochemistry*. 5: 289-301.
- Kaur, M. and N. Singh. 2005, Studies on functional, thermal and pasting properties of flours from different chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. *Food Chemistry* . 91(3): 403-411.
- Kaur, M. and N. Singh. 2007, Characterization of protein isolates from different Indian chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. *Food Chemistry* 102: 366-374.
- Khalil, M. O., Sarkadi, L. S. 1991. Biochemical studies of some non-conventional sources of protein, Part 5. Extraction and characterization of protein from fenugreek seed (*Trigonella foenum* L.). *Die Nahrung* 35. 3: 303-308.
- Kinsella, J. E. 1979. Functional properties of soy protein. *Journal of American Oil Chemists Society*, 56: 242-249.
- Kinsella, J. E. 1982. Relationship between structural and functional properties of food protein, In P. F. Fox & J. J. Condon (Eds.), *Food proteins* (pp. 51-60). London: Applied Science Publishers.
- Kiosseoglou, A. G., Doxastakis, S., & Alevisopoulos, K. S, 1999. Functional properties of Amaranth seed protein isolate. *International Journal of Food Technology*, 34: 253-260.
- Kramer, A., & Kwee, W. H. 1977. Functional and nutritional properties of tomato protein concentrates. *Journal of Food Science*, 42, 207-212.
- Lawal, O. S. 2004, Functionality of African locust bean (*Parkia biglobosa*) protein isolate: effects of pH, ionic strength and various protein concentrations. *Food Chemistry*, 86: 345-355.
- Leela, N. K., Shafeekh, K. M. 2008, Fenugreek, In Chemistry of spices, Parthasarathy, V. A., Chempakam, B., and Zachariah, T J, CAB International. London.
- Neto, V. Q., Narain, N., Silva, J. B., and Bora, P. S. 2001, Functional properties of raw and heat processed cashew nut (*Anarca-duim occidentale*, L.) kernel protein isolate. *Nahrung/Food*, 45: 258-262.
- Oladele, A. K. and J. O. Aina .2007, Chemical composition and functional properties of flour produced from two varieties of tigernut (*Cyperus esculentus*). *African Journal of Biotechnology* .6(21): 2473-2476.
- Oshodi, A. A., & Ojokan, E. 1997. Effect of salts on some of the functional properties of bovine plasma protein concentrate. *Food Chemistry*, 59: 333-338.
- Owusu-Apenten, R. K. 2002. Food protein analysis quantitative effects on processing. Marcel Dekker, Inc. New York • Basel.
- Patil, S. P., Niphadkar, P. V., & Bapat, M. M. 1997. Allergy of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*). *Annals of*

- Allergy, Asthma and Immunology*, 78: 297-300.
- Ragab, D. M., E. E. Babiker, *et al.* 2004, Fractionation, solubility and functional properties of cowpea (*Vigna unguiculata*) proteins as affected by pH and/or salt concentration. *Food Chemistry* 84(2): 207-212.
- Rao, P. U., Sesikaeran, B., Rao, P. S., Naidu, A. N., Rao, V. V., and Ramachandran, E. P. 1996, Short term nutritional and safety evaluation of fenugreek. *Journal of Nutrition Research*, 16: 1495-1505.
- Sauvaire, Y. D., Baccou, J. F., and Kobrehel, K. 1984, Solubilization and Characterization of Fenugreek Seed Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32: 41-47.
- S. Seena, K. R. Sridhar. 2005, Physicochemical, functional and cooking properties of Canavalia, *Food Chemistry*, 32: 406 – 412.
- Sikorski, Z. E. 2002, Chemical and Functional Properties of Food Components. Florida, CRC Press.
- Srinivasan, K. 2007, Fenugreek (*Trigonella foenum graecum*): A review of health beneficial physiological effects. *Food Reviews International*, 22: 203-224.
- Walsh, D.J., Cleary, D., McCarthy, E., Murphy, S., & FitzGerald, R.J. 2003. Modification of the nitrogen solubility properties of soy protein isolate following proteolysis and Trans glutaminase cross-linking. *Food Research International*, 36, 677-683.
- Wrostad, R.E., & Smith, D.E. 2010. Color analysis. P. 574- 587. In S.S. Nielsen (ed.) Food analysis. 4th ed. Springer science, New York.
- Yu, J. M. Ahmedna, M., and Goktepe, I. 2007, Peanut protein concentrate: Production and functional properties as affected by processing, *Food Chemistry*. 103: 121 – 129.

Effect of pH changes on functional properties of fenugreek protein isolate

S.Feyzi¹, M.Varidi^{2*}, F. Zare³, M. J. Varidi⁴

Received: 2013.03.05

Accepted: 2013.09.06

Introduction: Plant proteins play a significant role in the human diet, and among which legumes are excellent foods with several nutritional and functional advantages and low price. Among legumes, fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) seed, belonging to the Fabaceae family, is a great source of plant proteins, with a total protein content of about 25.00 – 38.60%. Functional properties are defined as physical and chemical properties, which could be altered due to the protein source and procedures used for flour preparation, protein concentrate and isolate extraction. Physicochemical parameters such as pH, temperature, salt and ionic strength can also highly affect proteins, functional properties. Therefore, in this study color parameters and functional properties of fenugreek protein isolate (FPI) were investigated. Also, the effect of pH changes on protein solubility, foaming capacity (FC) and stability (FS), emulsifying capacity (EC) and stability (ES) was studied.

Materials and methods: Fenugreek seeds were obtained from a retail market in Isfahan, Iran. All chemicals were of analytical grade, and were purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA), and Merck KGaA (Darmstadt, Germany).

Protein Isolation: Protein from 10g defatted fenugreek flour (DFF) was extracted with 0.33M sodium chloride solution; the ratio of DFF to NaCl solution was set at 1:20 (w/v) and pH was adjusted to 9.25. The stirring period was 2 h, during which pH was also adjusted. Aliquots were then centrifuged and supernatants were adjusted to pH 4.5 (isoelectric pH of fenugreek protein). Again, the protein solution was centrifuged in order to precipitate the protein. Protein precipitate was washed twice with deionized water, followed by centrifugation and resolubilization by adjusting the pH to 7.2. The extraction process was carried out at room temperature (25°C).

Color parameters: A digital colorimeter was used to measure the color of full fat and defatted fenugreek flours, and FPI samples. Color parameters were recorded in L*a*b* space.

Protein solubility: Protein solubility of FPI at pH 2-10 was determined. A 1.5% (w/v) solution of sample was made in deionized water for each pH. The solutions were treated with either 0.5M HCl or 0.5M NaOH to obtain certain pH (2-10), while stirring. The slurry was centrifuged to separate the supernatant. Protein content was determined by the Biuret method using spectrophotometer at 540nm wavelength. Calibration was done using bovine serum albumin (BSA) as external standard.

Viscosity: A suspension of 5% (w/v) FPI in distilled water was prepared. Viscosity of sample was determined using a programmable Brookfield rheometer, using spindle ULA at room temperature.

Coagulated protein: Percent of coagulated protein was measured by preparing 0.2g of FPI in 10mL of 0.025M citrate-phosphate buffer (pH 7.0). The solution was stirred, followed by centrifugation. The remaining supernatant was heated for 15min in a 100°C water bath, after cooling the same procedure was repeated. The absorbance of both samples, before heating (A_1) and after heating (A_2), was measured at 540nm according to Biuret method. The percent of coagulated protein was calculated by the following equation:

$$\text{Coagulated protein} = (A_1 - A_2 / A_1) \times 100 \quad (1)$$

Foaming capacity and stability: FC and FS were determined using 2% (w/v) FPI solution in distilled water. For each sample solution, the pH was adjusted to desired level (2, 3, 4.5, 6, 8, and 10). The solution was stirred slightly for 5min and then was whipped vigorously by a disperser. The volume of solution before whipping, also the total volume of solution and foam after whipping were recorded as V_0 and V_1 , respectively. The foam capacity percentage was calculated as:

$$\text{FC (\%)} = (V_1 - V_0 / V_0) \times 100 \quad (2)$$

Foam stability was determined as the total volume of solution and foam at 30, 60, 90 and 120 min at room temperature and it was recorded as V_2 . Foam stability (FS) was calculated as:

$$\text{FS (\%)} = (V_2 - V_0) \times 100 / (V_1 - V_0) \quad (3)$$

Emulsifying capacity and stability: For EC and ES, a 1% (w/v) FPI solution in distilled water was prepared.

1, 2, 4- Former MSc Student, Assistant professor and Associate professor, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Khorasan Razavi, Iran

3- Assistant professor, Bioresource Engineering Department, McGill University (Macdonald Campus)

(*-Corresponding Author Email: m.varidi@um.ac.ir)

The pH was adjusted to desirable level (2, 3, 4.5, 6, 8, and 10) followed by stirring for 5min, then sunflower oil was added. The mixture was homogenized to make emulsion, followed by centrifugation. Then the height of both emulsified layer after centrifugation (H_1) and the total height of content before centrifugation (H_0) were measured. Emulsion capacity was calculated as:

$$EC (\%) = (H_1/H_0) \times 100 \quad (4)$$

The ES (%) was calculated at 0, 30, 60, 90 and 120 min by measuring height changes (H_2).

$$ES (\%) = (H_2/H_1) \times 100 \quad (5)$$

Results and Discussion: FPI with 89.1% protein content had significantly ($p < 0.05$) lower L^* than DFF, while its L^* was higher than the full fat fenugreek flour. Also, FPI showed shear thinning behavior with viscosity equal to 1150, 922.5 and 787.5 cP at 15, 30 and 50 (1/s) shear rates, respectively. pH changes had noticeable effect ($p < 0.05$) on protein solubility, foam capacity and stability, also emulsifying capacity and stability. The lowest value of protein solubility was observed at pH 4.5, which indicated the isoelectric point of FPI. Moreover, the lowest amount of foaming capacity and emulsifying capacity of FPI was obtained at pI. The most foaming capacity (136%) and emulsifying capacity (39%), were obtained at pH 8 and 3, respectively. Also, FPI showed its best FS and ES at pH 4.5 and 8, respectively. Water and oil binding capacity of FPI were 2.7 and 6.6 (mL/g), respectively. In addition, the amount of coagulated protein of FPI was 3.77% which is proportional to its considerably high amount of protein solubility.

Keywords: Color Parameters, Fenugreek Protein Isolate, Functional Properties, pH, Viscosity.