

استخراج قلیایی پروتئین جوانه گندم با کمک اولتراسونیک: تأثیر بر بازده استخراج، خواص عملکردی و ساختار دوم

مینا مروتی^۱، احمد مولایی^{۱*}، مهدی علیجانیان^۲، ولی الله بابایی^۱

۱- دانشکده شیمی و مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران
۲- گروه آموزشی سلولی-مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، کرج، ایران

*صندوق پستی: ۱۷۷۴-۱۵۸۷۵، تهران، ایران
Molaeirad@gmail.com

پذیرش: ۱۴۰۵/۰۲/۱۹

دریافت: ۱۴۰۵/۰۱/۳۱

چکیده

جوانه گندم منبع غنی از پروتئین است، اما روش‌های سنتی استخراج معمولاً با محدودیت بازده مواجه هستند. هدف از پژوهش حاضر، بررسی تأثیر امواج اولتراسونیک به عنوان یک تیمار فیزیکی کمکی در مرحله انحلال قلیایی، بر بازده استخراج، خواص عملکردی و ساختار دوم پروتئین‌های جوانه گندم بود. در این مطالعه تجربی، آرد جوانه گندم چربی‌گیری شده تحت استخراج قلیایی همراه با اعمال امواج اولتراسونیک قرار گرفت و سپس پروتئین‌ها با روش ترسیب ایزوالکتریک جداسازی شدند. ویژگی‌های عملکردی شامل آب‌گریزی سطحی، خواص امولسیون‌کنندگی و کف‌کنندگی ارزیابی شد. همچنین، تغییرات ساختار دوم پروتئین‌ها توسط طیف‌سنجی دورنگ‌نمایی دورانی (CD) بررسی شد. نتایج نشان داد که کاربرد اولتراسونیک به طور چشمگیری سبب افزایش بازده استخراج از ۲۴٫۷۵ درصد (در روش مرسوم) به ۴۲٫۰۸ درصد شد. ظرفیت امولسیون‌کنندگی و آب‌گریزی سطحی پروتئین‌های تیمار شده با اولتراسونیک نسبت به روش مرسوم افزایش یافت؛ با این حال، پایداری امولسیون، ظرفیت و پایداری کف در آن‌ها با کاهش همراه بود. طیف‌سنجی CD نیز نشان داد که این تیمار فیزیکی تغییر محسوسی در ساختار دوم پروتئین‌ها ایجاد نکرده است. استفاده از امواج اولتراسونیک در فرایند استخراج قلیایی، روشی کارآمد برای افزایش چشمگیر بازده استخراج پروتئین جوانه گندم است. این روش با وجود ایجاد تغییرات در برخی خواص عملکردی، یکپارچگی ساختار پروتئین را حفظ کرده و پتانسیل بالایی برای کاربرد در صنایع غذایی دارد.

کلمات کلیدی: استخراج قلیایی و ترسیب ایزوالکتریک، امواج فراصوت، بازده استخراج، خواص عملکردی، جوانه گندم.

۱-مقدمه

در دهه‌های اخیر، نگرانی‌های زیست‌محیطی و آگاهی از مزایای سلامتی، تقاضای جهانی برای جایگزینی پروتئین‌های حیوانی با پروتئین‌های گیاهی را به شدت افزایش داده است. در این میان، غلات و محصولات جانبی آن‌ها مانند جوانه گندم، به عنوان منابعی غنی، ارزان و در دسترس از پروتئین‌های باکیفیت شناخته می‌شوند [۱-۴]. جوانه گندم غنی از مواد معدنی، ویتامین‌ها، فیبر رژیمی و فیتوکمیکال‌های کاربردی نظیر فلاونوئیدها، استرول‌ها، اکتاکوزانول و گلوکوتانیون است که می‌تواند در جلوگیری از برخی بیماری‌ها نقش داشته باشد [۵، ۶]. از منظر پروتئینی نیز، برخلاف بسیاری از پروتئین‌های گیاهی که فاقد برخی اسیدآمین‌های ضروری هستند، پروتئین‌های جوانه گندم دارای اسیدآمین‌های ضروری نظیر لیزین، متیونین و ترئونین بوده و از این رو نسبت به سایر منابع گیاهی برتری تغذیه‌ای دارند [۵، ۶]. با وجود این پتانسیل بالا، استخراج کارآمد این پروتئین‌ها از ماتریکس پیچیده گیاهی همچنان یک چالش مهم صنعتی به شمار می‌آید [۱، ۷].

در حال حاضر، رایج‌ترین روش برای جداسازی پروتئین‌های گیاهی که در پژوهش‌های پیشین نیز به تکرار برای آرد چربی‌گیری شده جوانه گندم استفاده شده است، استخراج قلیایی و ترسیب ایزوالکتریک (مبتنی بر تغییرات pH) است [۸-۱۰]. هزینه کم مواد مصرفی و سادگی نسبی تجهیزات، سبب برتری اولیه این روش شده است [۱۱، ۱۲]. با این وجود، مطالعات اخیر نشان می‌دهند که این روش سنتی دارای محدودیت‌های اساسی است. استفاده از حلال‌های شیمیایی و اعمال pH‌های به شدت قلیایی، نه تنها فرایندی زمان‌بر است، بلکه باعث دناتوراسیون پروتئین‌ها، تخریب ساختار فضایی و افت شدید خواص عملکردی حیاتی آن‌ها (مانند حلالیت، کف‌کنندگی و امولسیون‌کنندگی) می‌شود [۱، ۱۳]. دلیل اصلی راندمان پایین روش‌های مرسوم، عدم توانایی آن‌ها در تخریب کامل سد فیزیکی دیواره سلولی گیاه برای آزادسازی کامل پروتئین‌های داخل سلولی است [۱].

برای غلبه بر این چالش‌ها، استفاده از فرایندهای فیزیکی برای تخریب دیواره سلولی و ایجاد محیطی مطلوب برای

افزایش حلالیت پروتئین‌ها مورد توجه قرار گرفته است [۱۴]. امروزه گرایش به سمت استفاده از فناوری‌های سبز و غیرحرارتی، به ویژه امواج فراصوت (اولتراسونیک) به شدت افزایش یافته است [۱۵]. اعمال امواج اولتراسونیک با ایجاد کاویتاسیون صوتی باعث شکل‌گیری، رشد و فروپاشی شدید حباب‌ها در محیط مایع می‌شود [۱۶، ۱۷]. میکروجت‌ها و نیروهای مکانیکی حاصل از این ترکیدن‌ها، دیواره سلولی گیاه را به صورت فیزیکی متلاشی کرده و موجب افزایش چشمگیر انتقال جرم می‌شوند [۱۸]. تحقیقات نشان داده است که فرکانس‌های کمتر اولتراسونیک (در محدوده ۲۰ تا ۱۰۰ کیلوهرتز) باعث ایجاد حباب‌های کاویتاسیون بزرگ‌تری شده و انفجارهای شدیدتری را رقم می‌زنند که متعاقباً در فرایند استخراج مؤثرتر است [۱۹، ۲۰]. اگرچه در گذشته از این تکنیک برای بهبود استخراج ترکیبات مختلف نظیر روغن‌ها [۱۶] و بررسی پروتئین‌های هیدرولیز شده [۲۰، ۲۱] استفاده شده است، اما کاربرد نوین آن در استخراج پروتئین‌های گیاهی نتایج شگرفی به همراه داشته است. ترکیب روش تغییر pH با تیمارهای مکانیکی نظیر اولتراسونیک که امروزه تحت عنوان روش‌های قلیایی بهبودیافته شناخته می‌شوند، می‌تواند محدودیت‌های استخراج سنتی را به حداقل برساند [۱۳]. این رویکرد ترکیبی، نه تنها راندمان استخراج را افزایش می‌دهد، بلکه با اعمال یک اصلاح فیزیکی ملایم روی پروتئین، از تخریب آن جلوگیری می‌کند [۴]. در همین راستا، مطالعات اخیر به طور خاص روی پروتئین جوانه گندم اثبات کرده‌اند که استفاده از امواج فراصوت به عنوان نیروی محرک کمکی، نه تنها پارامترهای استخراج را بهینه کرده و بازدهی را به حداکثر می‌رساند [۲۲]، بلکه با ایجاد تغییرات مثبت در ساختار فضایی پروتئین، منجر به بهبود چشمگیر حلالیت، ظرفیت جذب آب و روغن، و خواص امولسیون‌کنندگی آن در مقایسه با روش استخراج سنتی می‌شود [۲۲].

بر این اساس و با توجه به ضرورت گذار از روش‌های مرسوم به تکنیک‌های نوین صنعتی، مطالعه حاضر با هدف بررسی جامع تاثیر اعمال تیمار مکانیکی اولتراسونیک به عنوان روشی کمکی در استخراج قلیایی-اسیدی پروتئین جوانه گندم انجام شده است. در این پژوهش تلاش شده است تا با بهینه‌سازی شرایط فرایند، ضمن افزایش بازدهی

استخراج، تاثیر این امواج بر تغییرات ساختاری و حفظ کیفیت خواص عملکردی پروتئین نهایی مورد ارزیابی قرار گیرد.

۲- مواد و روش‌ها

در این پژوهش جوانه گندم روغن‌کشی شده توسط پرس سرد، استفاده شد. مقدار پروتئین موجود در آن توسط روش کج‌دال (ضریب تبدیل ۵/۷) اندازه‌گیری شد. تمامی مواد شیمیایی مصرفی دارای درجه خلوص آزمایشگاهی^۱ بودند. حلال ان-هگزان برای چربی‌گیری، سدیم کلراید، سدیم هیدروکسید، هیدروکلریک اسید و نمک‌های مورد نیاز برای تهیه بافرهای فسفات، همگی از شرکت مرک آلمان تهیه شدند. همچنین، معرف‌های تخصصی شامل سدیم دودسیل سولفات، پروب فلورسانس ۱-آنیلینو-۸-نفتالین سولفونیک اسید (ANS) و پروتئین استاندارد آلبومین سرم گاوی (BSA) از شرکت سیگما-آلد ریچ آمریکا تهیه شد. روغن سویای مورد استفاده برای انجام آزمون امولسیون‌کنندگی نیز از یک برند تجاری استاندارد از بازار محلی تهیه شد.

۲-۱ آماده‌سازی آرد جوانه گندم چربی‌گیری شده (WGDF)

در ابتدا برای حذف چربی باقی‌مانده از جوانه گندم، از حلال ان-هگزان با نسبت جرمی-حجمی ۱ به ۳ (جوانه گندم: هگزان) استفاده شد. فرایند چربی‌گیری بر روی یک شیکر اوربیتال (مدل STUART SI50، ساخت انگلستان) با سرعت ۱۸۰ دور بر دقیقه (rpm) و به مدت ۸ ساعت در دمای محیط انجام شد. پس از اتمام زمان استخراج، مخلوط برای جداسازی حلال، زیر هود شیمیایی استاندارد (ساخت شرکت تجهیزات آزمایشگاهی بعثت، تهران، ایران) قرار داده شد تا حلال به‌طور کامل تبخیر و کنجاله در دمای اتاق خشک شود. سپس، کنجاله حاصل توسط یک آسیاب آزمایشگاهی پرسرعت (مدل تیغه‌ای، ناسیونال، ژاپن) کاملاً پودر شد و برای یکنواختی ذرات، از الک با مش ۶۰ (استاندارد ASTM) عبور داده شد. آرد چربی‌گیری شده نهایی تا زمان آزمایش‌های بعدی در ظروف دربسته و در دمای ۴ سانتی‌گراد نگهداری شد. مقدار پروتئین موجود در

آرد جوانه گندم چربی‌گیری شده توسط روش کج‌دال (با ضریب تبدیل ۵/۷) اندازه‌گیری شد.

۲-۲ همگن‌سازی WGDF و محلول نمکی با امواج اولتراسونیک

آرد جوانه گندم چربی‌گیری شده و محلول NaCl نیم مولار به نسبت ۱ به ۸ مخلوط شده و به مدت ۳۰ دقیقه روی همزن مغناطیسی مخلوط و سپس تحت امواج اولتراسونیک (شرکت توسعه فناوری مافوق صوت، قطر پروب ۴۵ میلی متر، ۳۰ ست، پالس‌های ۲۰ ثانیه on، ۱۰ ثانیه off) قرار گرفت. پس از گذشت این زمان، pH سوسپانسیون توسط NaOH یک مولار بر روی ۹/۵ تنظیم شد و پس از گذشت ۳۰ دقیقه از مخلوط شدن، سوسپانسیون به مدت ۲۰ دقیقه و با g ۲۸۰۰ سانتریفیوژ شد. مقدار پروتئین محلول رویی پس از سانتریفیوژ توسط روش بیوره سنجیده شد.

۲-۳ همگن‌سازی WGDF و محلول نمکی با هموژنایزر مکانیکی روتور-استاتور

آرد جوانه گندم چربی‌گیری شده و محلول NaCl نیم مولار به نسبت ۱ به ۸ مخلوط شده و به مدت ۳۰ دقیقه بر روی همزن مغناطیسی مخلوط و سپس به مدت ۵ دقیقه (پالس‌های ۳۰ ثانیه‌ای on و off) توسط هموژنایزر مکانیکی روتور-استاتور (Heidolph مدل DIAX 100) مخلوط شد و پس از آن pH بر روی ۹/۵ تنظیم شد و مطابق شرایط قبلی سانتریفیوژ شد. مقدار پروتئین موجود در محلول رویی توسط روش بیوره ارزیابی شد.

۲-۴ استخراج پروتئین از جوانه گندم چربی‌گیری شده (DWGP)

۲-۴-۱ روش مرسوم استخراج پروتئین
برای استخراج پروتئین‌های جوانه گندم از روش ژو و همکارانش [۱۰] با اندکی تغییر استفاده شد. در ابتدا سوسپانسیونی از آرد جوانه گندم چربی‌گیری شده و محلول NaCl نیم مولار به نسبت جرمی-حجمی ۱ به ۸ ساخته شد. سوسپانسیون به مدت ۳۰ دقیقه و در دمای اتاق مخلوط شد و سپس توسط NaOH یک مولار، pH آن بر روی ۹/۵ تنظیم و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق مخلوط شد. سوسپانسیون حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق

^۱ Analytical grade

۱۰۰ وات و فرکانس ثابت ۲۰ کیلوهرتز در ۳۰ سیکل عملیاتی (شامل ۲۰ ثانیه اعمال موج و ۱۰ ثانیه استراحت برای جلوگیری از افزایش ناگهانی دما) انجام شد. در طول فرایند، ظرف حاوی نمونه در حمام یخ قرار داده شد و دمای سوسپانسیون توسط دماسنج دیجیتال در محدوده ۲۶ تا ۲۷٫۵ درجه سانتی‌گراد کنترل شد. پس از اتمام تیمار اولتراسونیک، سوسپانسیون برای جداسازی بخش محلول، سانتریفیوژ شده و مراحل ترسیب اسیدی مطابق روش استخراج مرسوم تکرار شد. در نهایت، بازده استخراج پروتئین با استفاده از معادله ۱ محاسبه شد.

۳-۴ تعیین خواص عملکردی پروتئین‌های استخراج‌شده

۳-۴-۱ خصوصیات امولسیون‌کنندگی

توانایی امولسیون‌کنندگی و پایداری پروتئین‌های استخراج‌شده با روش پیرس و کینسلا^۱ [۲۴] تعیین شد. ۶ میلی‌لیتر محلول پروتئینی ۰/۱ w/v% در بافر فسفات ۰/۱ مولار با ۲ میلی‌لیتر روغن سویا مخلوط شد و سپس توسط هموژنایزر آزمایشگاهی (Heidolph مدل DIAX 100) در setting ۶ به مدت ۱ دقیقه هموژنیزه شد. ۵۰ µl از سوسپانسیون از انتهای فالكون برداشته شد و سپس با ۵ ml محلول SDS ۰/۱ درصد مخلوط شد. جذب محلول SDS در دقیقه صفر و ۱۰ در ۵۰۰ نانومتر خوانده شد. مقدار جذب در دقیقه صفر به عنوان فعالیت امولسیون (EA) در نظر گرفته شد. پایداری امولسیون نیز با معادله ۲ به دست آمد. از آلبومین سرم گاوی (BSA) به منظور مقایسه استفاده شد.

$$ES = A / A_0 \times 100 \quad (2)$$

A: جذب در دقیقه ۱۰

A₀: جذب در دقیقه صفر

۳-۴-۲ هیدروفوبیسیته سطحی

هیدروفوبیسیته سطحی DWGP با استفاده از پروب فلورسانس ۱-آنیلینو-۸-نفتالین سولفونیک اسید (ANS) و مطابق روش کاتو و ناکائی [۲۵] اندازه‌گیری شد. پودر لیوفیلیزه و بافر فسفات ۰/۱ M مخلوط و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق توسط همزن مغناطیسی همزده شد. مخلوط

و با ۲۸۰۰ g سانتریفیوژ (PIT مدل Universal320) شد. مقدار پروتئین محلول در سوپرناتانت توسط روش بیوره سنجیده شد. برای رسوب پروتئین‌ها در نقطه ایزوالکتریک، pH محلول رویی توسط محلول HCl با غلظت ۱ مولار بر روی ۴ تنظیم و پس از ۳۰ دقیقه دوباره با همان شرایط قبل سانتریفیوژ شد. رسوب به دست آمده سه مرتبه با آب مقطر شسته شد و پس از تنظیم pH آن بر روی ۷ توسط خشک کن انجمادی (CHRIST مدل ALPHA2-4) خشک شد و برای آنالیزهای بیشتر در دمای ۴ سانتی‌گراد نگهداری شد. محتوای پروتئینی رسوب لیوفیلیزه شده توسط روش کجلدال (ضریب تبدیل ۵/۷) به دست آمد. کمیت و کیفیت آمینواسیدهای پروتئین‌های استخراج‌شده در این مرحله با استفاده از آمینواسید آنالایزر اندازه‌گیری شد. بازده استخراج پروتئین‌ها با استفاده از معادله ۱ محاسبه شد. الگوی توزیع پروتئین‌ها در آرد جوانه گندم چربی‌گیری شده و پروتئین‌های استخراج‌شده در این مرحله توسط روش الکتروفورز SDS PAGE و مطابق روش لاملی [۲۳] به دست آمد. برای این هدف، از ژل بالای ۵ درصد و ژل پایین ۱۲/۵ درصد استفاده شد. الکتروفورز با ولتاژ ۹۰ ولت و به مدت دو ساعت و نیم انجام شد.

$$(1) \quad \text{وزن DWGP} = \frac{\text{وزن DWGF استفاده شده}}{\text{بازده استخراج پروتئین}}$$

۲-۴-۲ استخراج پروتئین به کمک امواج

اولتراسونیک (در مرحله انحلال قلیایی)

بر اساس نتایج حاصل از ارزیابی‌های اولیه (آزمون بیوره) و با توجه به کارایی بالاتر هموژنایزر اولتراسونیک در مقایسه با هموژنایزر مکانیکی در آزادسازی پروتئین، از این فناوری برای بهبود مرحله انحلال قلیایی استفاده شد. بدین منظور، سوسپانسیونی از DWGF در محلول سدیم کلراید ۰٫۵ مولار (مطابق روش استخراج مرسوم) تهیه شد و pH آن بر روی ۹٫۵ تنظیم شد. سپس، سوسپانسیون مذکور توسط یک دستگاه هموژنایزر اولتراسونیک پروب‌تایپ (مدل FUP-20، شرکت توسعه فناوری مافوق صوت، تهران، ایران) مجهز به پروب تیتانیومی با قطر ۴۵ میلی‌متر، تحت تیمار قرار گرفت. عملیات سونیکاسیون با توان خروجی

¹ Pearce and Kinsella

V0: حجم کف در زمان صفر

V: تغییر حجم کف در زمان t

۴-۴ تعیین ساختار دوم پروتئین‌ها

طیف دو رنگ نمایی دورانی در ناحیه فرابنفش دور در محدوده ۱۹۰ تا ۲۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروپلاریومتر (Aviv مدل ۲۱۵) با استفاده از سل ۰/۱ سانتی‌متری در دمای ۲۵ سانتی‌گراد به‌دست آمد. محلول پروتئینی با غلظت ۰/۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر توسط حل کردن پودر لیوفیلیزه پروتئین در بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH برابر ۷/۴ به‌دست آمد. همه طیف‌ها با استفاده از تفریق از بافر شاهد اصلاح شدند.

۵- نتایج و بحث

۵-۱ تأثیر امواج اولتراسونیک و هموژنایزر در مرحله

همگن‌سازی DWGF و محلول NaCl

استفاده از هموژنایزر اولتراسونیک و هموژنایزر مکانیکی روتور-استاتور در مرحله همگن‌سازی DWGF و محلول NaCl سبب بهبود همگن‌سازی شد، به‌طوری که مقدار پروتئین‌های محلول که توسط روش بیوره اندازه‌گیری شد، در این دو روش نسبت به عدم استفاده از تیمار مکانیکی، بیشتر بود (شکل ۱). تأثیر هموژنایزر اولتراسونیک نسبت به هموژنایزر مکانیکی بیشتر بود که این به‌دلیل انرژی بیشتر وارده و تخریب وسیع‌تر دیواره سلولی توسط فروپاشی حباب‌های شکل‌گرفته شده در مایع توسط هموژنایزر اولتراسونیک است. امواج اولتراسونیک با افزایش انتقال جرم و فروپاشی حباب‌های کاویتاسیون نزدیک دیواره‌های سلولی سبب تخریب دیواره سلولی و نفوذ بهتر حلال به سلول‌ها می‌شود [۲۶]. هموژنایزر مکانیکی نیز از طریق برش هیدرولیکی و دینامیکی و کاویتاسیون عمل می‌کند [۲۷].

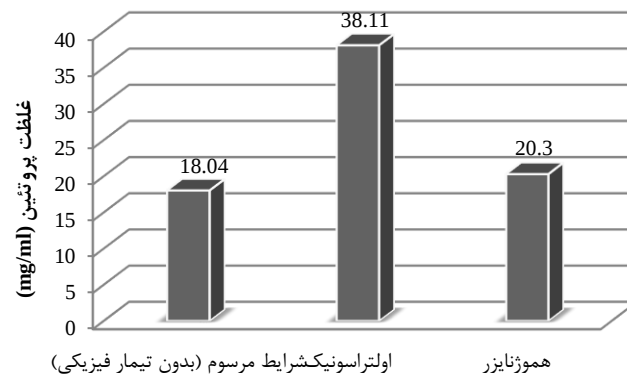
برای بررسی تأثیر تیمارهای مکانیکی در مرحله انحلال قلیایی از روش هموژنایزر اولتراسونیک استفاده شد و مقدار بازده استخراج این روش با روش مرسوم (بدون استفاده از تیمار مکانیکی) مقایسه شد.

سپس با ۹۰۰۰ g و به مدت ۳۰ دقیقه و در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد و غلظت پروتئین توسط روش بردفورد سنجیده شد. سری رقت در غلظت‌های مختلف آماده شد. برای خوانش جذب فلورسانس نمونه‌ها، به ۱ میلی‌لیتر از هر غلظت پروتئین آماده‌شده، ۱۲ میکرولیتر محلول ANS (محلول ۸ میلی‌مولار در بافر فسفات ۰/۱ مولار و pH ۷) اضافه شد. به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی انکوباسیون انجام شد. سپس، جذب نمونه‌ها از رقیق به غلیظ توسط اسپکتروفتومتر فلورسانس (varian Carry eclipse) در طول موج برانگیختگی ۳۶۵ نانومتر و طول موج نشر ۴۸۴ اندازه‌گیری شد. پهنای برانگیختگی و نشر دستگاه به ترتیب بر روی ۵ و ۱۰ نانومتر تنظیم شد. نمودار غلظت پروتئین در مقابل شدت فلورسانس توسط نرم‌افزار اکسل رسم شد و معادله مربوطه به‌دست آمد. برای تعیین هیدروفوبیسیت، رگرسیون خطی شدت فلورسانس بر روی محور Y در مقابل غلظت پروتئین در محور X تعیین شد. شیب خط معادله رگرسیون، به‌عنوان شاخصی برای تعیین هیدروفوبیسیت پروتئین‌ها در نظر گرفته شد. از آلبومین سرم گاوی (BSA) برای مقایسه استفاده شد.

۳-۴-۳ کف‌کنندگی

برای تعیین خصوصیت کف‌کنندگی پروتئین‌های استخراج‌شده، از روش ژو و همکارانش (۲۰۱۰) [۱۰] با اندکی تغییرات استفاده شد. همچنین، برای آماده‌سازی کف و نحوه گزارش این کمیت از روش هیتاراکچی (۱۹۹۶) [۹] استفاده شد. ۲ گرم پودر لیوفیلیزه شده با بافر فسفات ۰/۰۵ مولار و pH ۷ در یک استوانه مدرج ۱۰۰ میلی‌لیتری مخلوط و به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد. مخلوط، سپس توسط هموژنایزر (Heidolph مدل DIAX 100) با سرعت ۲۲۰۰۰ rpm به مدت ۹۰ ثانیه در دمای اتاق هم زده شد. حجم مخلوط در زمان صفر بلافاصله و پس از گذشت زمان‌های ۲، ۵، ۸، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ دقیقه اندازه‌گیری شد. مقدار حجم کف شکل‌گرفته در زمان صفر به‌عنوان توانایی کف‌کنندگی (FC) بیان شد و از معادله ۳ پایداری کف به‌دست آمد.

$$FS = V0 \times \frac{t}{V} \quad (3)$$



شکل ۱ تأثیر تیمارهای فیزیکی در مرحله همگن سازی DWGPF و محلول نمکی

از امواج اولتراسونیک نشان دادند. ژو و همکارانش [۶] بازده استخراج ۲۴ تا ۳۷ درصد با محتوای پروتئین نسبتاً بالای ۸۸/۵ درصد را در استخراج به روش مرسوم استخراج قلیایی و ترسیب اسیدی گزارش دادند. هیتاراکچی [۹] بازده استخراج ۱۸ تا ۲۸ درصد همراه با محتوای پروتئینی ۹۰/۳ درصد را گزارش داد. زو و سان [۱۰] نیز بازده استخراج ۲۸ درصدی استخراج DWGP به روش مرسوم استخراج قلیایی و ترسیب اسیدی و بازده ۳۰ درصد به روش میسل معکوس نشان دادند.

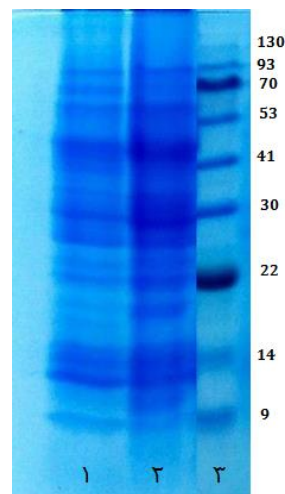
۵-۲ توزیع پروتئین های استخراج شده در DWGP

برای بررسی کارایی روش استخراج قلیایی و ترسیب اسیدی در استخراج پروتئین های جوانه گندم از روش الکتروفورز SDS PAGE استفاده شد. باندهای پروتئینی در محدوده ۹ تا ۹۱ کیلو دالتون مشاهده شد (شکل ۲). الگوی الکتروفورز پروتئین استخراج شده تقریباً مشابه الگوی الکتروفورز پروتئین آرد جوانه گندم چربی گیری شده با هگزان بود.

نتایج نشان داد استفاده از اولتراسونیک در روش استخراج قلیایی تأثیر بسزایی در افزایش بازده استخراج پروتئین ها داشت به طوری که میزان بازده استخراج از ۲۴/۷۵ درصد به ۴۲/۰۸ درصد افزایش یافت. خلوص پروتئین استخراج شده به روش اولتراسونیک، در مقایسه با روش مرسوم، کمتر بود؛ به طوری که میزان خلوص پروتئین در روش اولتراسونیک ۱۸۳/۶۵ درصد در مقابل ۷۰۸/۷۷ درصد در روش مرسوم گزارش شد. (جدول ۱). میدان اولتراسونیک ایجاد شده در محیط مایع سبب به وجود آمدن حفره هایی می شود که فروپاشی (کولاپس) این حفره ها امواج شوکی هیدرودینامیکی شدیدی را سبب می شود و در نتیجه پالس های فشاری شدید به وجود آمده، مواد در مجاورت حفره تخریب می شود [۲۸]. به این ترتیب، استفاده از اولتراسونیک سبب بیشتر شکسته شدن دیواره سلولی گیاهی شده و خروج پروتئین از آن ها تسهیل و افزایش می یابد. چیتاپالو و نوم هورم [۲۹] نیز در استخراج پروتئین های سبوس برنج به کمک اولتراسونیک به نتایج مشابهی رسیدند و افزایش بازده استخراج در هنگام استفاده

جدول ۱ نتایج به دست آمده برای خصوصیت امولسیون، هیدروفوبیسیت و محتوای پروتئین

محتوای پروتئین در % DWGF	محتوای پروتئین (%)	بازده استخراج (%)	نوع نمونه پروتئین
۳۱/۴	۷۷/۷۰۸	۲۴/۷۵	پروتئین استخراج شده به روش مرسوم
۳۱/۴	۶۵/۱۸۳	۴۲/۰۸	پروتئین استخراج شده به کمک اولتراسونیک



شکل ۲ الگوی الکتروفورز آرد جوانه گندم چربی گیری شده (۱) و پروتئین استخراج شده (۲)

۴-۱-۵ خصوصیات امولسیون و هیدروفوبیسیته

توانایی امولسیون کنندگی و هیدروفوبیسیته پروتئین استخراج شده از نمونه تحت تیمار اولتراسونیک، نسبت به پروتئین استخراج شده به روش مرسوم، بیشتر بود. این افزایش را می توان به باز شدن نسبی پروتئین تحت تأثیر اولتراسونیک نسبت داد. با این حال، پایداری امولسیون در نمونه تیمار شده با اولتراسونیک، در مقایسه با نمونه استخراج شده به روش مرسوم، کمتر بود. همچنین، خصوصیات امولسیونی و هیدروفوبیسیته آلبومین سرم گاوی از هر دو نمونه پروتئین جوانه گندم بیشتر بود (جدول ۳). کم بودن پایداری امولسیونی را نیز می توان به کمتر بودن محتوای پروتئینی و بیشتر بودن ناخالصی هایی نظیر کربوهیدرات و چربی در پروتئین های استخراج شده تحت تیمار اولتراسونیک نسبت داد. همچنین، باز شدن نسبی پروتئین ها نیز دلیل دیگری است که می تواند موجب ناپایداری بیشتر پروتئین ها و در نتیجه کاهش پایداری امولسیون شود. مطالعات نشان داده اند که ارتباطی بین هیدروفوبیسیته سطحی و سایر خصوصیات عملکردی پروتئین وجود دارد. به طوری که، نمونه های با هیدروفوبیسیته بالاتر خصوصیات امولسیون کنندگی بالاتری دارند [۲۵]. در پژوهش حاضر نیز، ارتباط بین فعالیت امولسیون کنندگی و هیدروفوبیسیته نشان داده شد.

این شباهت نشان می دهد که روش استخراج مورد استفاده از کارایی مناسبی برخوردار بوده و توانسته است بخش عمده ای از اجزای پروتئینی موجود در نمونه را استخراج کند. نتایج حاصل از الگوی الکتروفورزی با یافته های گزارش شده توسط جی و سان (۲۰۰۰) نیز مطابقت داشت [۳۰].

۵-۳ مقدار و نوع آمینواسیدهای موجود در پروتئین های استخراج شده

در پژوهش انجام شده، ۱۷ نوع آمینواسید در پروتئین های استخراج شده به روش مرسوم مشاهده شد. از این تعداد، ۹ آمینواسید مربوط به آمینواسیدهای ضروری است. اکثر غلات، فاقد آمینواسید لیزین می باشند. در این پژوهش مقدار این اسید آمینه ۵/۵ درصد برآورد شد. بیشترین اسید آمینه مشاهده شده مربوط به گلوتامیک اسید با ۱۲/۴ درصد، و کمترین اسید آمینه مشاهده شده مربوط به سیستئین با ۱/۰۳ درصد بود که نشان دهنده کم بودن باندهای دی سولفیدی در این پروتئین ها است. اسید آمینه های آسپارتیک اسید، آرژنین و لوسین نیز به فراوانی مشاهده شدند. اسید آمینه پرولین در آزمون تشخیص آمینواسیدها، مشاهده نشد. نتایج به دست آمده از این پژوهش با نتایج پژوهش های دیگر در این زمینه در جدول ۲ آورده شده است.

۵-۴ تعیین خصوصیات عملکردی

جدول ۲ پروفایل آمینواسیدها در DWGP استخراج شده به روش مرسوم (پروتئین g/100 g) و مقایسه آن با سایر پژوهش‌ها.

FAO/WHO/UNO		ژو و سان (۲۰۱۰) DWGRMPI	ژو و سان (۲۰۱۰) DWGPI	ژو (۲۰۰۶) DWGPI	DWGF ژو ۲۰۰۶	پژوهش انجام شده	نوع آمینواسید	
کودکان	بزرگسالان							
آمینواسیدهای ضروری								
۱/۳	۲/۸	۲/۰۶	۲/۹۲	۴/۲۰	۲/۹۲	۳/۷	ایزولوسین	۱
۱/۹	۶/۶	۴/۷۸	۵/۳۸	۷/۸	۶/۶۴	۶/۲	لوسین	۲
۱/۶	۵/۸	۶/۹۳	۴/۹۶	۶/۷۲	۶/۶۹	۵/۵	لیزین	۳
۱/۷	۲/۵	۱/۳۰	۱/۶۲	۲/۱۱	۱/۶۴	۲/۱	متیونین	۴
۱/۹	۶/۳	۲/۳۲	۳/۲۳	۴/۸۹	۴/۰۶	۳/۸	فنیل آلانین	۵
۰/۹	۳/۴	۲/۷۷	۲/۵۸	۴/۱۳	۴/۵۰	۳/۵	ترئونین	۶
۱/۳	۳/۵	۳/۱۷	۴/۴۵	۶/۳۷	۴/۵۳	۴/۴	والین	۷
۱/۶	۱/۹	۲/۳۷	۲/۱۲	۲/۸۲	۲/۴۷	۲/۱۷	هیستیدین	۸
۰/۵	۱/۱	-	-	۰/۶۸	۱/۱۵	۱/۳	تریپتوفان	۹
آمینواسیدهای غیر ضروری								
		۵/۳۱	۴/۲۱	۹/۸۱	۷/۸۹	۵/۴	آلانین	۱۰
		۹/۳۵	۶/۸۲	۶/۱۱	۶/۴۳	۶/۹۳	آرژنین	۱۱
		۳/۸۱	۵/۳۱	۹/۳۴	۹/۴۳	۸/۹	آسپارتیک اسید	۱۲
		۰/۷۷	۰/۴۲	۰/۶۲	۰/۷۷	۱/۰۳	سیستئین	۱۳
		۹/۵۱	۱۰/۳۹	۱۵/۰۸	۱۵/۱۹	۱۲/۴	گلوتامیک اسید	۱۴
		۶/۲۶	۴/۶۷	۵/۹۳	۵/۶۴	۴/۶	گلیسین	۱۵
		۳/۵۳	۳/۳۰	۴/۸	۴/۴۶	۴/۴۱	سرین	۱۶
		۱/۹۷	۲/۰۷	۳/۲۴	۲/۳۹	۲/۹۸	تیروزین	۱۷
		۴/۶۷	۲/۹۸	۵/۱۵	۶/۴۵	-	پرولین	۱۸

هرچه هیدروفوبیسیته پروتئین افزایش یابد، کشش سطحی بیشتر کاهش می‌یابد و در نتیجه سبب افزایش فعالیت امولسیون‌کنندگی می‌شود. به این معنا که گروه‌های قطبی پروتئین‌های هیدروفوب به سمت فاز آبی و گروه‌های آب‌گریز آنها به سمت فاز غیرقطبی، جهت‌گیری آسان‌تری

خواهند داشت و سبب کاهش انرژی آزاد در سطح می‌شوند. از سوی دیگر، پروتئین‌های هیدروفوب به آسانی با روغن میانکش می‌دهند. هیدروفوبیسیته مؤثر پروتئین‌ها نقش مهمی را در میانکش‌های پروتئین-لیپید بازی می‌کند [۲۵].

جدول ۳ خصوصیات عملکردی پروتئین‌های استخراج‌شده

توانایی امولسیون	پایداری امولسیونی (%)	هیدروفوبیسیت	توانایی کف‌کنندگی (ml)	پایداری کف	
۰/۲۵۲۳	۶۳/۱۳۹ %	۳۲۲/۱	۹	۲۷۰	روش مرسوم
۰/۴۰۴	۵۶/۰۶ %	۳۷۹/۲۹	۵	۲۵۰	اولتراسونیک
۰/۶۹۵	۶۷/۷۷ %	۳۱۶۳/۱	-	-	آلبومین سرم گاوی

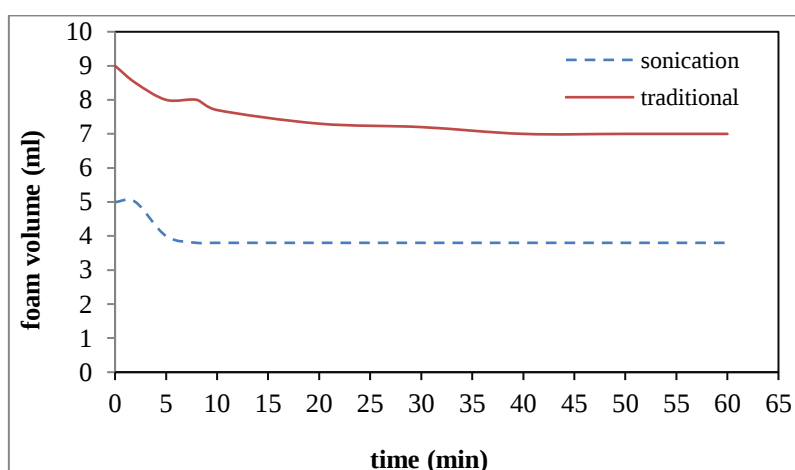
۵-۴-۲ کف‌کنندگی

مقدار کف تشکیل شده در محلول پروتئینی در روش استخراج اولتراسونیک، به‌طور قابل توجهی کمتر از محلول پروتئینی به روش مرسوم بود (شکل ۱ و جدول ۳). این کاهش احتمالاً ناشی از کمتر بودن به محتوای پروتئینی کمتر (کم بودن خلوص پروتئین) در نمونه استخراج‌شده به روش اولتراسونیک مربوط است. از سوی دیگر، حلالیت کمتر پروتئین‌های استخراج‌شده به روش اولتراسونیک در مقایسه با پروتئین‌های استخراج‌شده به روش مرسوم نیز می‌تواند در کاهش میزان کف تشکیل‌شده نقش داشته باشد (جدول ۳). برای حفظ پایداری کف در محلول پروتئینی، مولکول‌های پروتئین باید پلیمرهای بین مولکولی پیوسته‌ای را شکل دهند که حباب‌های هوا را احاطه کند

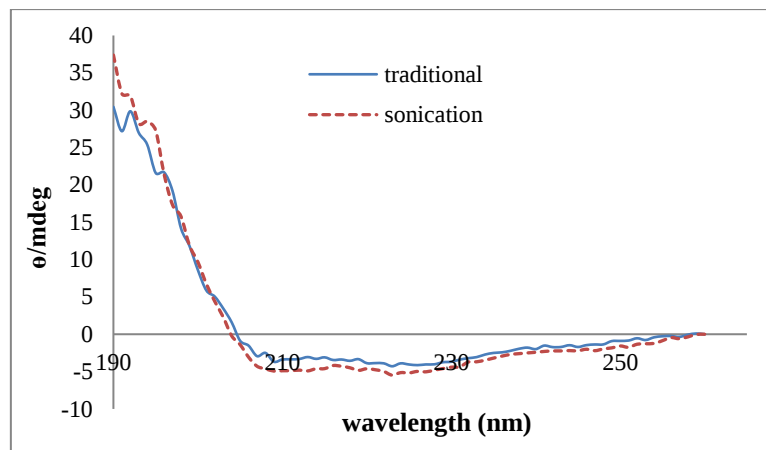
[۲۹]. چیتاپالو و نوم هورم نیز نشان دادند مقدار کف‌کنندگی پروتئین‌های سبوس برنج استخراج‌شده به روش اولتراسونیک، از پروتئین استخراج‌شده به روش مرسوم استخراج قلیایی و ترسیب اسیدی کمتر بود. آن‌ها این کاهش را به حلالیت کمتر پروتئین‌های استخراج‌شده به روش اولتراسونیک نسبت به پروتئین‌های استخراج‌شده به روش مرسوم نسبت دادند [۲۹].

۵-۴-۳ ساختار دوم پروتئین‌ها

دو رنگ نمایی دورانی (CD) تکنیکی برای اندازه‌گیری ساختار دوم و سوم پروتئین‌ها محسوب می‌شود. طیف CD UV دور DWGP استخراج‌شده به روش مرسوم و تحت تیمار اولتراسونیک در شکل ۲ نمایش داده شده است.



شکل ۲ مقایسه خصوصیات کف‌کنندگی



شکل ۲ طیف دورنگ نمایی در ناحیه UV دور پروتئین‌های جوانه گندم استخراج شده به دو روش مرسوم و اولتراسونیک

داد که امواج اولتراسونیک تأثیری بر ساختار دوم پروتئین‌ها نگذاشته است. همچنین، تیمار اولتراسونیک موجب افزایش قدرت امولسیون‌کنندگی و هیدروفوبیسته پروتئین‌های استخراج‌شده شد؛ با این حال، بر خصوصیات کف‌کنندگی پروتئین‌ها تأثیر منفی گذاشته و باعث کم شدن قدرت کف‌کنندگی و ثبات کف در این پروتئین‌ها شد. نتایج حاصل از آنالیز کیفی و کمی اسیدآمین‌ها نیز، مبین غنی بودن این پروتئین‌ها از اسید آمینه‌ها، به‌ویژه اسیدآمین‌های ضروری است. با توجه به این نتایج و ویژگی‌های مناسب عملکردی این پروتئین‌ها، استخراج با بازده مناسب این پروتئین‌ها برای استفاده در محصولات مختلف غذایی، آرایشی، بهداشتی و غیره، توصیه می‌شود.

۷- منابع

- [1] Ayça Akyüz, İdil Tekin, Zülal Aksoy, and Seda Ersus, "Plant Protein Resources, Novel Extraction and Precipitation Methods: A Review," *Journal of Food Process Engineering*, 2024.
- [2] Kausar Jahan, Alweera Ashfaq, Kaiser Younis, Owais Yousuf, and R. Ul Islam, "A review of the effects of ultrasound-assisted extraction factors on plant protein yield and functional properties," *Journal of Food Measurement and Characterization* 2022.
- [3] F. Li, Y. Wu, D. Li, Y. Han, and Y. Tao, "Novel extraction, purification, and processing technologies for plant proteins," 2023.

طبق نتایج حاصل از تست دورنگ نمایی دورانی، تغییر چشمگیری در ساختار دوم پروتئین‌ها در پروتئین‌های استخراج‌شده تحت تیمار اولتراسونیک نسبت به پروتئین‌های استخراج‌شده به روش مرسوم، مشاهده نشد. این امر نشان می‌دهد که تیمار اولتراسونیک تأثیر چندانی بر ساختار دوم پروتئین‌ها نداشته است.

۶- نتیجه‌گیری

بازده بالای استخراج پروتئین‌های گیاهی یکی از مولفه‌های اساسی در کاربرد این پروتئین‌ها در محصولات صنعتی است. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد، استفاده از تیمارهای فیزیکی نظیر امواج اولتراسونیک می‌تواند بهبود چشمگیری را در افزایش بازده استخراج ایجاد کند. همچنین، نتایج حاصل از طیف دورنگ نمایی دورانی نشان

- [4] J. Tang, D. Yao, S. Xia, L. Cheong, and M. Tu, "Recent progress in plant-based proteins: From extraction and modification methods to applications in the food industry " *Food Chemistry*: X 2024.
- [5] Y. Ge, A. Sun, Y. Ni, and T. Cai, "Study and development of a defatted wheat germ nutritive noodle," *European Food Research and Technology*, vol. 212, pp. 344-348, 2001.
- [6] K. X. ZHU, H. M. ZHOU, and H. F. QIAN, "Comparative study of chemical composition and physicochemical properties of defatted wheat germ flour and its protein isolate,"

- Journal of food biochemistry, vol. 30, pp. 329-341, 2006.
- [7] Q. Zhang and X. Li, "Advances in the extraction, modification, and application of wheat germ protein: A comprehensive review," Foods, 2023.
- [8] M. Mondor and A. J. H. á. ndez-Álvarez, "Emerging Solvent Extraction Technologies for Plant Protein Extraction: Aqueous Two-Phase Extraction; Deep Eutectic Solvent; Subcritical Water Extraction," 2023.
- [9] N. Hettiarachchy, V. Griffin, and R. Gnanasambandam, "Preparation and functional properties of a protein isolate from defatted wheat germ," Cereal Chemistry, vol. 73, pp. 364-367, 1996.
- [10] K.-X. Zhu, X.-H. Sun, Z.-C. Chen, W. Peng, H.-F. Qian, and H.-M. Zhou, "Comparison of functional properties and secondary structures of defatted wheat germ proteins separated by reverse micelles and alkaline extraction and isoelectric precipitation," Food Chemistry, vol. 123, pp. 1163-1169, 2010.
- [11] R. Sánchez-Vioque, A. Clemente, J. Vioque, J. Bautista, and F. Millán, "Protein isolates from chickpea (*Cicer arietinum* L.): chemical composition, functional properties and protein characterization," Food Chemistry, vol. 64, pp. 237-243, 1999.
- [12] F. Liu, Z. Chen, L. Wang, and R. Wang, "Effects of protein solubilisation and precipitation pH values on the functional properties of defatted wheat germ protein isolates," International Journal of Food Science & Technology, vol. 48, pp. 1490-1497, 2013.
- [13] M. Hadidi, F. Aghababaei, and D. J. McClements, "Enhanced alkaline extraction techniques for isolating and modifying plant-based proteins," Food Hydrocolloids 2023.
- [14] S. Tang, N. S. Hettiarachchy, and T. H. Shellhammer, "Protein extraction from heat-stabilized defatted rice bran. 1. Physical processing and enzyme treatments," Journal of agricultural and food chemistry, vol. 50, pp. 7444-7448, 2002.
- [15] M. Navaf et al., "Contemporary insights into the extraction, functional properties, and therapeutic applications of plant proteins," Journal of Agriculture and Food Research 2023.
- [16] G. d. M. Rodrigues, B. T. F. d. Mello, V. A. d. S. Garcia, and C. d. Silva, "Ultrasound-assisted extraction of oil from macauba pulp using alcoholic solvents," Journal of Food Process Engineering, vol. 40, p. e12530, 2017.
- [17] M. H. Entezari, S. H. Nazary, and M. H. Khodaparast, "The direct effect of ultrasound on the extraction of date syrup and its micro-organisms," Ultrasonics Sonochemistry, vol. 11, pp. 379-384, 2004.
- [18] Z. Sultan, A. Ashfaq, K. Jahan, O. S. Qadri, K. Younis, and O. Yousuf, "pH shift extraction technique for plant proteins: A promising technique for sustainable development," Energy Nexus, 2024.
- [19] M. Esclapez, J. García-Pérez, A. Mulet, and J. Cárcel, "Ultrasound-assisted extraction of natural products," Food Engineering Reviews, vol. 3, p. 108, 2011.
- [20] C. Zhou, H. Ma, X. Yu, B. Liu, A. E.-G. A. Yagoub, and Z. Pan, "Pretreatment of defatted wheat germ proteins (by-products of flour mill industry) using ultrasonic horn and bath reactors: Effect on structure and preparation of ACE-inhibitory peptides," Ultrasonics sonochemistry, vol. 20, pp. 1390-1400, 2013.
- [21] K.-X. Zhu, X.-H. Sun, and H.-M. Zhou, "Optimization of ultrasound-assisted extraction of defatted wheat germ proteins by reverse micelles," Journal of Cereal Science, vol. 50, pp. 266-271, 2009.
- [22] L. Yang and H. Chen, "Optimization of ultrasound-assisted extraction parameters for wheat germ protein and evaluation of its structural characteristics," Food Chemistry 2023.
- [23] U. K. Laemmli, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4," nature, vol. 227, p. 680, 1970.
- [24] K. N. Pearce and J. E. Kinsella, "Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique," Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 26, pp. 716-723, 1978.
- [25] A. Kato and S. Nakai, "Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins," Biochimica et biophysica acta (BBA)-Protein structure, vol. 624, pp. 13-20, 1980.

- [26] M. Toma, M. Vinatoru, L. Paniwnyk, and T. Mason, "Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction," *Ultrasonics sonochemistry*, vol. 8, pp. 137-142, 2001.
- [27] P. Dhankhar, "Homogenization fundamentals," *IOSR J. Eng*, vol. 4, pp. 1-8, 2014.
- [28] G. Scherba, R. Weigel, and W. O'brien, "Quantitative assessment of the germicidal efficacy of ultrasonic energy," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 57, pp. 2079-2084, 1991.
- [29] T. Chittapalo and A. Noomhorm, "Ultrasonic assisted alkali extraction of protein from defatted rice bran and properties of the protein concentrates," *International journal of food science & technology*, vol. 44, pp. 1843-1849, 2009.
- [30] Y. Ge, A. Sun, Y. Ni, and T. Cai, "Some nutritional and functional properties of defatted wheat germ protein," *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 48, pp. 6215-6218, 2000.

Ultrasound-assisted alkaline extraction of wheat germ protein: Effects on extraction yield, functional properties, and secondary structure

Mina Morevaoti¹, Ahamad Molaei Rad^{1*}, Mehdi AlijanianZadeh², Valiollah Babaeipour¹

1. Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, Malek Ashtar University of Technology
2. Cellular and Molecular Biology group, Faculty of Biology, University of Kharazmi, Karaj, Iran

Molaeirad@gmail.com

Receipt: 2026/04/20

Accepted: 2026/05/09

Abstract

Wheat germ is a valuable source of protein; however, conventional extraction techniques often suffer from limited yields. This study aimed to evaluate the impact of ultrasonic waves as an assisting physical treatment during alkaline solubilization on the extraction yield, functional properties, and secondary structure of wheat germ proteins. In this experimental study, defatted wheat germ flour underwent alkaline extraction combined with ultrasonic treatment, followed by protein isolation through isoelectric precipitation. Functional properties—including surface hydrophobicity, emulsifying capacity, and foaming characteristics—were assessed. In addition, changes in the secondary structure of the proteins were examined using Circular Dichroism (CD) spectroscopy. Ultrasonic treatment significantly enhanced the extraction yield, increasing it from 24.75% (conventional method) to 42.08%. The ultrasonicated proteins showed improved surface hydrophobicity and emulsifying capacity compared with those obtained by the conventional method. However, reductions were observed in emulsion stability, foaming capacity, and foam stability. CD spectroscopy revealed that ultrasound treatment did not induce significant changes in the secondary structure of the proteins. The application of ultrasonic waves during alkaline extraction is an effective approach to markedly improve wheat germ protein yield. Although this technique modifies certain functional properties, it maintains the structural integrity of the proteins, indicating strong potential for use in food industry applications.

Keywords: Alkaline extraction–isoelectric precipitation, Ultrasound, Extraction yield, Functional properties, Wheat germ.