نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۲۶ شماره ۲/ سال ۱۳۹۵

مقایسه روش‌های قلیایی و آنزیمی استخراج در ویژگی‌ها و راندمان هیدرولیز پروتئین دانه گوجه‌فرنگی

معصومه امیری اندی[1*]، علی معتمدزادگان[2] و سید هاشم حسینی‌پرور[2]

تاریخ دریافت: ۹٤/٦/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹٤/۹/۱٤

[1] دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
[2] به‌ترتیب دانشیار و استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده مهندسی زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
* مسئول مکاتبه: masoumehamiri@yahoo.com

چکیده

در تحقیق حاضر پروتئین دانه گوجه‌فرنگی با استفاده از استخراج قلیایی در pHهای ۱۰، ۱۱ و ۱۲، استخراج آنزیمی توسط آنزیم‌های آلکالاز ۲/٤L و فلاورزیم ۵۰۰L با غلظت‌های ۱ و ۲ درصد و تلفیقی از استخراج آنزیمی و قلیایی تولید شد. راندمان استحصال و خلوص پروتئین، درجه هیدرولیز و وزن مولکولی پروتئین‌های استخراج شده ارزیابی گردید. نتایج نشان داد که پروتئین هیدرولیز شده توسط آلکالاز به‌صورت معنی‌داری از لحاظ راندمان استخراج پروتئین (۷۸/۸ درصد) بالاتر از سایر پروتئین‌های استحصال شده بود ($p<۰/۰۵$). اما هیچ تفاوت معنی‌داری از لحاظ خلوص پروتئین با پروتئین‌های حاصل از استخراج قلیایی وجود نداشت ($p>۰/۰۵$). در بررسی اثر استخراج قلیایی پس از هیدرولیز آنزیمی مشخص شد که خلوص پروتئین و در نتیجه راندمان استخراج نسبت به هیدرولیز منفرد آنزیمی کاهش یافت. علاوه بر این، در مقایسه با پروتئین‌های حاصل از استخراج قلیایی، وزن مولکولی پروتئین‌های هیدرولیز شده متناسب با وسعت هیدرولیز آنزیمی کاهش یافت. بنابراین پروتئین‌های هیدرولیز شده توسط آلکالاز با توجه به درجه هیدرولیز بالاتر پپتیدهایی با وزن مولکولی کمتر از ۱۰ کیلو دالتون داشتند. به طور کلی، استخراج پروتئین تحت تاثیر pH، نوع و غلظت آنزیم مورد استفاده قرار گرفته بود.

واژگان کلیدی: دانه گوجه‌فرنگی، استخراج قلیایی، هیدرولیز آنزیمی، پروتئین

مقدمه

امروزه با توجه به سیر رو به رشد جمعیت جهان و عرضه محدود پروتئین‌های حیوانی، تقاضا برای منابع ارزان و جایگزین پروتئین‌های حیوانی برای تولید مواد غذایی باارزش افزوده افزایش یافته است. در این راستا به استفاده از فراورده‌های جانبی توجه زیادی شده است. منابع پروتئینی مانند پروتئین ذرت، سبوس برنج، ضایعات ماهی و غیره مورد مطالعه قرار گرفتند، اما کاربرد این پروتئین‌ها به علت منابع اندک عرضه و یا

عملکرد نامناسب هنوز محدود است (شن و همکاران، ۲۰۰۸).

گوجه‌فرنگی یکی از محصولات گیاهی است که به‌طور گسترده در جهان کشت می‌شود. در حال حاضر ایران با تولید بیش از ٦ میلیون و ۳۳٤ هزار تن، ششمین کشور تولیدکننده گوجه‌فرنگی در جهان است (جهاد کشاورزی، ۱۳۹۳). حدود ۱/۳ از کل گوجه‌فرنگی تولیدی به کارخانه‌ها رفته و بر روی آن فرایند صورت می‌گیرد. در نتیجه فرآوری گوجه‌فرنگی تفاله حاصل می‌گردد که میزان آن برابر با ۳ تا ٥ درصد وزنی محصول تازه است (رویز سلما و همکاران، ۲۰۰۹). نزدیک به ٦۰ درصد از وزن خشک این ضایعات را بذر گوجه‌فرنگی تشکیل می‌دهد که به‌طور متوسط حاوی ۳۳/۹- ۲۲/۲ درصد پروتئین، ۲۲ درصد چربی و غنی از اسیدهای آمینه مختلف است (دل وال و همکاران، ۲۰۰۳)، همچنین فاقد فاکتورهای ضد تغذیه‌ای یا مواد سمی است که آن را از سایر ضایعات مشابه متمایز می‌کند (ایگرز، ۱۹۷٥). بنابراین بازیابی و استفاده از پروتئین‌های دانه گوجه‌فرنگی برای مصرف انسانی مورد مطالعه قرار گرفت.

در بین روش‌های توسعه یافته برای استخراج پروتئین از منابع گیاهی (استخراج با نمک، اسید، قلیا و آنزیم) استخراج با اسید زیاد موثر نیست، به‌عنوان مثال حداکثر استخراج پروتئین از نخودفرنگی زرد تنها ۲۰ درصد بود (سوئتریزنو و هولمز، ۱۹۹۲). لتلیف و نور (۱۹۸۳) نیز در استفاده از سه نوع منعقد کننده اسیدی (اسیدسیتریک، اسیدکلریدریک و مخلوط مساوی دو اسید) برای استحصال پروتئین از دانه گوجه‌فرنگی به این نتیجه رسیدند که نوع اسید تاثیری بر میزان پروتئین خام ندارد. لیاداکیس و همکاران (۱۹۹۸) با بررسی استخراج پروتئین دانه گوجه‌فرنگی با محلول‌های نمکی (کلرید مس و سولفات مس) به این نتیجه رسیدند که بالاترین عملکرد پروتئین با استخراج آبی (بدون نمک) بدست می‌آید.

با این حال، استفاده از محلول‌های قلیایی به‌طور گسترده به‌عنوان یک روش موثر و عملی برای استخراج پروتئین از منابع گیاهی شناخته شده است. در استخراج قلیایی ۹٥ درصد از پروتئین کنجاله کلزا (ایل ناکراشی و همکاران، ۱۹۷۷) و ۷۰ درصد از پروتئین کنجاله آفتابگردان (سگیروگلو و همکاران، ۲۰۰۹) بازیابی شده است. در این راستا طالعی و همکاران (۱۳۹۰) امکان تولید کنسانتره پروتئینی از ضایعات خط تولید رب گوجه‌فرنگی را به روش قلیایی بررسی کردند. اگرچه شرایط قلیایی قابلیت استخراج پروتئین را بهبود می‌بخشد و منجر به عملکرد بالای پروتئین می‌شود، اما استخراج قلیایی شدید باعث واکنش‌های جانبی نامطلوب مانند هیدرولیز و دناتوراسیون پروتئین‌ها، افزایش اجزاء غیر پروتئینی، راسمیک شدن اسیدهای آمینه، کاهش قابلیت هضم پروتئین، آسیب به برخی از اسیدهای آمینه (لیزین و سیستئین) و تولید فاضلاب زیاد می‌شود (چاوز و فیلی، ۱۹۸٤). به همین دلیل برای به حداقل رساندن واکنش‌های جانبی و مشکلات زیست محیطی، استخراج به کمک آنزیم مورد توجه قرار گرفت.

در چند سال اخیر، پروتئازهای مختلف برای هیدرولیز جزئی پروتئین‌ها به پپتیدها و در نتیجه افزایش حلالیت آن‌ها و استخراج آسان‌تر مورد استفاده قرار گرفتند. انواع پروتئازها با توجه به اسید آمینه خاصی که مورد هدف قرار می‌دهند درجه هیدرولیز مختلفی را ایجاد می‌کنند. پروتئین‌های هیدرولیز شده کاربرد زیادی در صنعت غذا دارند، از آن جمله می‌توان به پایدارکننده نوشیدنی‌ها و ترکیبات تشدیدکننده طعم در فراورده‌های قنادی اشاره کرد (گوالیا و اربن، ۱۹۹۰). از طرف دیگر به دلیل کوتاه بودن زنجیره پپتیدی قابلیت هضم بالایی داشته و می‌توانند به‌عنوان مکمل پروتئینی در تغذیه انسان، دام و آبزیان مورد استفاده قرار گیرند.

در این مطالعه، امکان استفاده از روش آنزیمی در مقایسه با روش قلیایی و ترکیب دو روش فوق در غلظت‌های مختلفی از آنزیم و قلیا برای استخراج پروتئین از دانه

گوجه‌فرنگی مورد مطالعه قرار گرفت. دو آنزیم آلکالاز و فلاورزیم با توجه به کاربرد گسترده در صنایع غذایی و ایمن و در دسترس بودن برای این تحقیق انتخاب شدند.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی ماده اولیه

ضایعات ناشی از فرآوری گوجه‌فرنگی از کارخانه رب گوجه‌فرنگی گلنوش کرج تهیه گردید. از روش رسوبی برای جداسازی دانه‌ها از تفاله گوجه‌فرنگی استفاده شد (طالعی و همکاران، ۱۹۹۰). بدین منظور تفاله‌ها در ظروف پلاستیکی بزرگ در آب غوطه‌ور شده که دانه‌ها به علت سنگینی ته‌نشین و از پوسته جدا می‌شود. دانه‌ها پس از جداسازی شسته و در آون (ULM 400, Memmert, Germany) با دمای ٤٠°C به مدت ٢٤ ساعت خشک شدند. برای بدست آوردن نمونه‌های یکنواخت، بذر آسیاب (MB 1001B, Magic Bullet Blender, China) و از الک با مش ٠/٤٢ میلی‌متر عبور داده می‌شود. آرد حاصله با حلال هگزان به نسبت ٥:١ در ٣ مرحله به مدت ٢٤ ساعت به کمک شیکر اوربیتالی (TM 52E, Fan Azma Gostar, Iran) چربی‌گیری شده و برای جداسازی حلال نمونه ٢٤ ساعت در آون با دمای ٤٠°C قرار گرفت. برای بدست آوردن پودر خوب آرد چربی‌گیری شده برای عبور از الک با مش ٠/٢٥ میلی‌متر دوباره آسیاب و در کیسه‌های پلی اتیلنی در یخچال ١٨- °C تا زمان مصرف نگهداری شد.

آنزیم

به‌منظور هیدرولیز آنزیمی پودر دانه گوجه‌فرنگی آنزیم آلکالاز ٢/٤L و آنزیم فلاورزیم ٥٠٠L از شرکت نووزایم دانمارک خریداری شد. آلکالاز ٢/٤L یک اندوپپتیداز از باسیلوس لیکنی فورمیس با فعالیت آنزیمی ٢/٤ آنسون (Anson) به ازای هر میلی‌لیتر آنزیم است. دمای بهینه آلکالاز ٧٥-٥٥ درجه سانتی‌گراد و pH بهینه آن ٨/٥-٦/٥ است. هر واحد آنسون به‌صورت میزان آنزیم لازم برای آزادسازی یک میلی اکی والان تیروزین از هموگلوبین دناتوره شده با اوره در دقیقه در دمای ٢٥ °C درجه سانتی‌گراد و pH=٧/٥ تعریف می‌شود. فلاورزیم ٥٠٠L ترکیبی از اندو و اگزوپپتیداز از آسپرژیلوس اوریزا با فعالیت یک آمینوپپتیداز لوسین در هر گرم است (LAPU/g). دمای بهینه فلاورزیم ٧٠-٥٠ درجه سانتی‌گراد و pH بهینه آن ٧-٥ است. هر LAPU مقدار آنزیمی است که یک میکرو مول لوسین- p- نیتروآنیلید را در هر دقیقه هیدرولیز می‌کند (راندل و همکاران، ٢٠١١).

استخراج پروتئین

استخراج قلیایی

٢٠ گرم آرد حاصل با ٦٠٠ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط و به کمک محلول سود یک نرمال pH در درجات ١٠، ١١ و ١٢ تنظیم شد. این سوسپانسیون در دمای محیط به مدت ١ ساعت در ٣٠٠ دور در دقیقه بر روی همزن (HM 21, Fan Azma Gostar, Iran) مخلوط و با استفاده از سانتریفوژ (Z 200 A, Hermle, Germany) با سرعت ٣٧٥٠ دور در دقیقه به مدت ١٥ دقیقه سانتریفوژ شد. pH مایع رویی جمع‌آوری گردیده با استفاده از اسیدکلریدریک یک نرمال بر روی نقطه ایزوالکتریک پروتئین گوجه‌فرنگی (٣/٩) رسانده شد. سپس در شتاب ٣٠٠ دور در دقیقه به مدت ٣٠ دقیقه هم زده شد. رسوب حاصله با استفاده از سانتریفوژ با سرعت ٢٠٠٠ دور در دقیقه به مدت ١٠ دقیقه جدا شده و با استفاده از خشک‌کن انجمادی (FDU-8624, Operon, Korea) خشک و پس از توزین، در کیسه پلی اتیلنی در دمای ١٨- °C نگهداری شد (شائو و همکاران، ٢٠١٣).

استخراج آنزیمی پروتئین

٢٠ گرم آرد دانه گوجه‌فرنگی روغن‌کشی شده را با ٢٠٠ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط کرده و pH با افزودن سود یک نرمال و درجه حرارت بسته به آنزیم مورد استفاده (pH=٧ و دمای ٥٠ درجه سانتی‌گراد برای فلاورزیم و pH=٨/٥ و دمای ٦٠ °C برای آلکالاز) تنظیم شده و به مدت ٣٠ دقیقه توسط ویبراتور هم زده شد، سپس آلکالاز

یا فلاورزیم (۲-۱ درصد) اضافه شد و به مدت ۲ ساعت واکنش انجام گرفت. از سود یک نرمال نیز برای ثابت نگه‌داشتن pH در طول هیدرولیز آنزیمی استفاده شد. آنزیم آلکالاز در دمای ۹۰ و فلاورزیم در دمای °C ۸۵ به مدت ۱۵ دقیقه غیرفعال گردید. سپس به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۳۷۵۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و مایع رویی جدا شد. مایع رویی توسط خشک‌کن انجمادی خشک شده و پس از توزین، در کیسه پلی اتیلنی در دمای °C ۱۸- نگهداری شد (انگ و خان، ۲۰۱۲). پروتئین هیدرولیز شده توسط آلکالاز (Alcalase Hydrolysate) و فلاورزیم (FlavourzymeHydrolysate) با علائم اختصاری AH و FH نشان داده شدند.

استخراج آنزیمی- قلیایی پروتئین:

در این قسمت مطابق روش بالا پس از پایان فرایند هیدرولیز و غیرفعال کردن آنزیم، استخراج قلیایی در دو سطح pH ۱۱ و ۱۲ به مدت ۱ ساعت در دمای محیط انجام شد. نمونه‌های پروتئینی بدست آمده در این قسمت با علائم AH1%-11، AH2%-11، AH1%-12، AH2%-12 و FH1%-11، FH2%-11، FH1%-12، FH2%-12 مشخص شده‌اند، که به‌عنوان مثال در AH1%-11، AH1% بیانگر نمونه هیدرولیز شده با ۱٪ آنزیم آلکالاز (Alcalase Hydrolyate 1%) و عدد ۱۱ بیانگر استخراج قلیایی در pH=۱۱ است.

تعیین ترکیب شیمیایی

برای تعیین میزان رطوبت، چربی، پروتئین و خاکستر از روش استاندارد (AOAC، ۲۰۰۲) استفاده گردید. میزان پروتئین محلول در سوپرناتانت نیز با استفاده از روش اسپکتروفتومتری (T80+ UV/VIS, PG instrument, England) بیورت (لین، ۱۹۷۵) با اندازه‌گیری شدت جذب در طول موج ٥٤٠ نانومتر انجام گرفت. به همین منظور برای رسم نمودار استاندارد از پروتئین آلبومین سرم گاوی شرکت زیست شیمی با غلظت ٤٠ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استفاده گردید.

اندازه‌گیری راندمان استخراج پروتئین

راندمان استخراج پروتئین بر اساس فرمول زیر محاسبه گردید (سلینگ و همکاران، ۲۰۱۳):

$$\text{راندمان} = \left(\frac{\text{وزن پروتئین استخراج شده} \times \text{محتوای پروتئین}}{\text{وزن دانه گوجه‌فرنگی} \times \text{محتوای پروتئین دانه}}\right) \times ۱۰۰ \%$$

اندازه‌گیری درجه هیدرولیز پروتئین

درجه هیدرولیز به روش ستیول و همکاران (۲۰۰۳) اندازه‌گیری شد. مبنای این روش اندازه‌گیری درصد نسبت پروتئین‌های محلول در تری کلرواستیک اسید ۱۰٪ به کل پروتئین‌های موجود در نمونه می‌باشد. برای این منظور ۵ میلی‌لیتر از نمونه با پنج میلی‌لیتر از تری کلرواستیک اسید ۲۰٪ مخلوط گردید و پس از هم زدن به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۳۷۵۰ دور بر دقیقه طی ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس مقدار پروتئین در فاز محلول اندازه‌گیری و میزان درجه هیدرولیز (DH) با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد.

$$DH = \frac{\text{نیتروژن محلول در TCA ۱۰٪}}{\text{کل نیتروژن نمونه}} \times ۱۰۰$$

تعیین وزن مولکولی

سدیم دو دسیل سولفات پلی اکریل آمید ژل الکتروفورز (SDS- PAGE) به روش لاملی (۱۹۷۰) انجام شد. از الگوی الکتروفورز با ژل متراکم کننده ۸٪ و ژل جدا کننده ۱۵٪ استفاده شد.

آنالیز آماری

به‌منظور مقایسه خصوصیات پروتئین‌های استخراج شده، از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون آماری دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد. نرم افزار آماری SPSS برای کارهای آماری و Excel برای رسم نمودار استفاده شد.

بحث و نتایج

ترکیب شیمیایی

نتایج مربوط به ترکیب شیمیایی دانه گوجه‌فرنگی در جدول ۱ ارائه شده است.

استخراج قلیایی

بررسی نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها نشان می‌دهد که با افزایش pH از ۱۰ به ۱۲، ابتدا خلوص پروتئین افزایش و سپس کاهش یافت (p<۰/۰۵)، به‌طوری که بیشترین و کمترین غلظت پروتئین مربوط به pH ۱۱ و ۱۰ است. با این حال، با افزایش pH راندمان پروتئین از ۳۷/۵ به ٥٤/٩٧ درصد افزایش یافت (شکل ۱). بنابراین حداکثر راندمان در pH=۱۲ با توجه به تولید ماده خشک بیشتر ملاحظه گردید (p<۰/۰۵).

جدول ۱- آنالیز تقریبی ترکیبات دانه گوجه‌فرنگی

ترکیبات (درصد وزن مرطوب)*					
رطوبت	چربی	خاکستر	فیبر و کربوهیدرات	پروتئین آرد کامل	پروتئین آرد چربی‌گیری شده
٥/٠±٠٢/١٢	١٦/٠±٧٨/٣٤	٣/٠±١٢/٠٧٥	٤٨/١±٢٥/٠٢	٢٦/١±٨٤/٤٠	٣٩/١±٧٣/٩٥

* هر عدد میانگین سه تکرار آزمایش است (میانگین ± انحراف از معیار)

کاهش خلوص پروتئین در شرایط قلیایی شدید (pH =۱۲) به دلیل افزایش استخراج ترکیبات غیر پروتئینی مانند چربی‌ها و کربوهیدرات‌ها در طول آماده‌سازی کنساتنره پروتئینی است (شائو، ۲۰۱۳). نتیجه بدست آمده مطابقت داشت با تحقیقات اروموسل و همکاران (۲۰۰۸) که با افزایش غلظت قلیا استخراج پذیری پروتئین لوبیای شیرین آفریقایی از ۱۷/۸ به ۱٤/۹ درصد کاهش یافت، همچنین انگ و خان (۲۰۱۲) در محلول قلیایی با pH=۱۱ به بالاترین محتوای پروتئین دست یافتند.

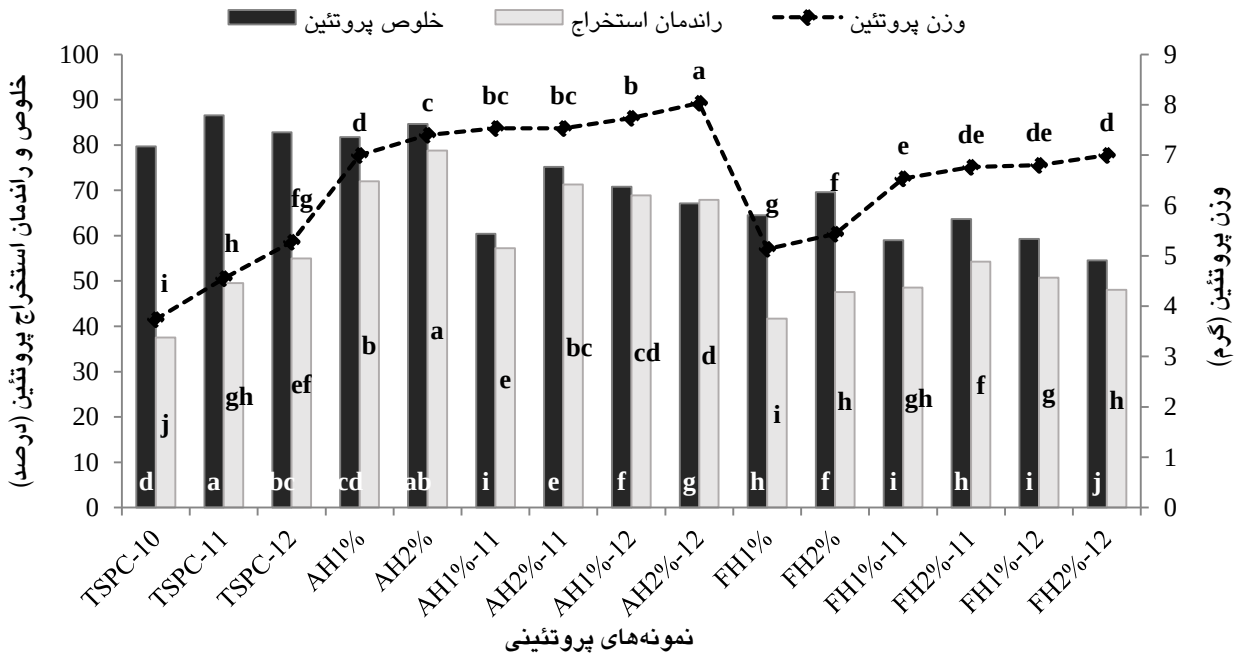
با این حال غلظت بالای قلیا باعث تغییرات شدید در پروتئین و همچنین تخریب و کاهش کیفیت آن می‌شود. به همین دلیل برای جلوگیری از این مشکلات، استخراج آنزیمی پیشنهاد شده است.

هیدرولیز آنزیمی

هیدرولیز آنزیمی دانه گوجه‌فرنگی توسط دو آنزیم آلکالاز و فلاورزیم با دو غلظت ۱ و ۲ درصد انجام شد. افزایش غلظت آنزیم منجر به افزایش خلوص و راندمان پروتئین شد. بالاترین خلوص و راندمان مربوط به AH2% با مقدار ٨٤/٦٣ و ٧٨/٨٠ درصد و پایین‌ترین خلوص و راندمان پروتئین مربوط به FH1% با مقدار عددی ٦٤/٥٣ و ٤١/٧٠ درصد بود. همان‌طور که مشاهده شده بین خلوص و راندمان پروتئین با درجه هیدرولیز رابطه مستقیمی وجود دارد.

آنزیم‌های مختلف با توجه به ماهیت خاص آن‌ها، غلظت و زمان فرایند، قابلیت‌های متفاوتی در استخراج پروتئین دارند. با افزایش غلظت آنزیم، حلالیت پروتئین داخل حلال افزایش یافته و منجر به افزایش راندمان استخراج می‌شود (شن و همکاران، ۲۰۰۸). در بین دو آنزیم استفاده شده آلکالاز با توجه به فعالیت پروتئولیتیکی بالاتر قادر به استخراج پروتئین بیشتر نسبت به فلاورزیم است (شکل ۱). ژائو و همکاران (۲۰۱۲) به این نتیجه رسیدند که پروتئازهای قلیایی مانند آلکالاز نسبت به پروتئازهای خنثی مانند فلاورزیم و اسیدی مانند پپسین فعالیت بالاتر و درنتیجه توانایی بیشتری در حل کردن پروتئین دارند. در واقع، آنزیم‌های پروتئولیتیک به‌سرعت با ذرات پروتئینی نامحلول تعامل برقرار کرده و زنجیره پلی پپتیدی را سست و و به آرامی شروع به هیدرولیز ذرات می‌کنند (انگ و خان، ۲۰۱۲). بنابراین، اگر واکنش آنزیم و سوبسترا کم باشد، برای رسیدن به شرایط مطلوب یا باید غلظت آنزیم یا زمان واکنش را افزایش داد.

کارهای تحقیقاتی بسیاری نتایج بدست آمده در این قسمت را تایید می‌کند. موهام‌یانکاکا و همکاران (۲۰۱۳) با هیدرولیز پروتئین کدو تنبل توسط آنزیم‌های آلکالاز، پروتامکس، نئوتراز و فلاورزیم نشان دادند که بالاترین محتوای پروتئین (۹۲/۲ درصد) توسط آنزیم آلکالاز بدست آمد. قالی و همکاران (۲۰۱۳) نیز بالاترین عملکرد پروتئین (۷٦/۳۰ درصد) از ماهی خال‌مخالی (Mackerel) را با استفاده از ۲ درصد آنزیم آلکالاز گزارش نمودند و بیان کردند که با افزایش غلظت آنزیم از ۱ به ۲ درصد راندمان از ٤۷/۱۸ به ٥٤/٤٦ درصد افزایش یافت.



شکل ۱- محتوا و راندمان استخراج پروتئین دانه گوجه‌فرنگی استخراج شده به روش‌های قلیایی و آنزیمی

هیدرولیز آنزیمی- استخراج قلیایی

در استخراج قلیایی پس از هیدرولیز توسط آلکالاز، AH2%-11 بالاترین خلوص (۷٥/۱۷ درصد) و راندمان پروتئین (۷۱/۲۹ درصد) و AH1%-11 پایین‌ترین خلوص (٦۰/٤۰ درصد) و راندمان (٥۷/۲٥ درصد) را نشان داد. در استخراج قلیایی پس از هیدرولیز توسط فلاورزیم، FH2%-11 بالاترین خلوص و راندمان (٦۳/۷۰ و ٥٤/۲۷ درصد) و FH2%-12 کمترین خلوص و راندمان پروتئین (٥٤/٥۳ و ٤۸/۰۳ درصد) را نشان داد.

بنابراین، همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود علی رغم نتیجه مورد انتظار، طی این فرایند نه تنها خلوص پروتئین افزایش نیافته، بلکه به علت استخراج ترکیبات غیر پروتئینی و تعامل این ترکیبات با پروتئین و احتمالا راسمیک شدن اسیدهای آمینه، خلوص پروتئین و در نتیجه راندمان استخراج نسبت به هیدرولیز آنزیمی به‌تنهایی کاهش یافت. اما نسبت به روش قلیایی، راندمان افزایش یافته است. بالاترین خلوص پروتئین زمانی بدست آمده که از شدت کمتر قلیا (pH=۱۱) و غلظت بالاتر آنزیم (۲ درصد) استفاده شد. بنابراین نتیجه گرفته می‌شود که اگر هر دو پارامتر در حداکثر یا حداقل مقدار خود باشند کمترین خلوص و راندمان پروتئین بدست می‌آید.

در روش اخیر تاکنون تحقیقاتی صورت نگرفته و تنها ژانگ و همکاران (۲۰۰۷) اثر استخراج قلیایی (pH ۹، ۱۰ و ۱۱) و پس از آن هیدرولیز آنزیمی توسط آلکالاز در غلظت‌های (۰/٥، ۱ و ۱/٥ درصد) را بررسی نمودند. آن‌ها

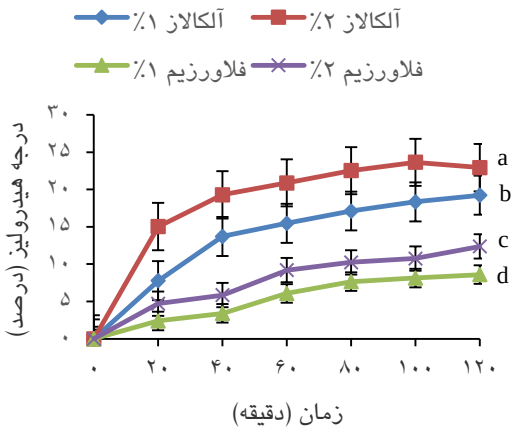
بیان کردند افزایش pH منجر به افزایش راندمان در غلظت کمتر آنزیم می‌شود و همچنین آن‌ها به این نتیجه رسیدند که pH استخراج قلیایی عامل غالب برای تغییر قابل توجه عملکرد پروتئین نمی‌باشد، از آنجایی که پروتئاز قادر به هیدرولیز و استخراج پروتئین‌های نامحلول است.

درجه هیدرولیز پروتئین

نتایج مربوط به تغییرات درجه هیدرولیز در طول زمان واکنش در شکل ۲ ارائه شده است. نتایج نشان داد که با افزایش زمان هیدرولیز و غلظت آنزیم، درجه هیدرولیز افزایش پیدا می‌کند. این در حالی است که از شدت و نرخ هیدرولیز کاسته می‌شود، به‌طوری که بیشترین میزان هیدرولیزاسیون در ٦٠ دقیقه اول رخ داده است. این حالت در دو آنزیم مشابه بوده است. بالاترین درجه هیدرولیز توسط آلکالاز ۲ درصد و پایین‌ترین درجه هیدرولیز توسط فلاورزیم ۱ درصد پس از ۲ ساعت هیدرولیز به ترتیب ۲۲/۹۳ و ۸/٦ درصد بدست آمد ($p<0/05$).

احتمالا علت افزایش درجه هیدرولیز با افزایش غلظت آنزیم را می‌توان به شکستن باندهای پپتیدی بیشتر مرتبط دانست. انگ و خان (۲۰۱۲) نشان دادند که با افزایش غلظت آنزیم آلکالاز و فلاورزیم تا ٤ درصد، درجه هیدرولیز افزایش می‌یابد و پس از آن تقریبا ثابت می‌شود.

مقایسه بین درجه آبکافت دو آنزیم در پایان واکنش (شکل ۲) نشان داد که درجه هیدرولیز توسط آنزیم آلکالاز به‌صورت معنی‌داری از فلاورزیم بالاتر می‌باشد ($p<0/05$). نتایج سایر محققین نیز، نتایج حاضر را تایید می‌کند (کلامپانگ و همکاران، ۲۰۰۷؛ نعمتی و همکاران، ۲۰۱۲؛ موهام‌یانکاکا و همکاران، ۲۰۱۳) دلیل این حالت را می‌توان در میزان فعالیت اختصاصی‌تر و بیشتر آنزیم آلکالاز نسبت به فلاورزیم دانست.



شکل ۲- اثر زمان واکنش و غلظت آنزیم آلکالاز و فلاورزیم بر درجه هیدرولیز

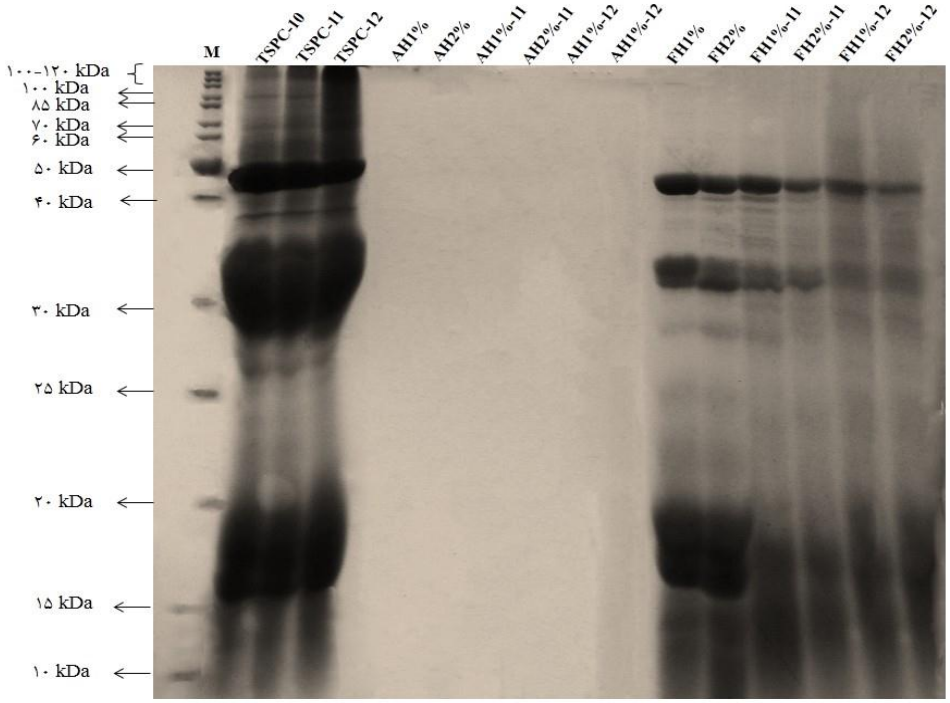
از طرف دیگر، مشاهده شده با افزایش زمان آبکافت از سرعت هیدرولیز کاسته شد. علت این حالت را می‌توان چنین توجیه نمود که با افزایش زمان آبکافت، تعداد باندهای پپتیدی در دسترس آنزیم کاهش پیدا می‌کند، در واقع سرعت بالای مرحله اول مربوط به شکست آسان پیوند پپتیدی است و در مرحله دوم سرعت واکنش به علت دشواری هیدرولیز باندهای پپتیدی فشرده‌تر کاهش می‌یابد، همچنین از میزان فعالیت پروتئولتیکی آنزیم کاسته می‌شود. از طرف دیگر، اکسیداسیون چربی‌ها یا ناخالصی‌های غیر پروتئینی و شکل‌گیری ترکیباتی که ممانعت کننده فعالیت آنزیمی هستند نیز می‌تواند در این

امر موثر باشد (اویسی پور و همکاران، ۲۰۰۹؛ آمزا و همکاران، ۲۰۱۳).

وزن مولکولی

وزن مولکولی پروتئین‌های استخراج شده از دانه گوجه‌فرنگی تا ۱۰ کیلودالتون برآورد شد. با توجه به شکل ۳ الگوی الکتروفورز پروتئین‌های حاصل از استخراج قلیایی در pHهای ۱۰، ۱۱ و ۱۲ تقریبا مشابه هم و شامل دامنه وسیعی از پروتئین‌ها با وزن مولکولی کمتر از ۱۰ کیلو دالتون و بیشتر از ۲۰۰ کیلو دالتون است، که شامل آلبومین‌ها، گلوبولین‌ها (ویسلین، α- لگومین و β- لگومین)، گلیادین‌ها و گلوتنین‌ها می‌باشد (باسلر، ۲۰۰۹).

هیدرولیز آنزیمی توسط آلکالاز، بخش‌های پروتئینی با وزن مولکولی بالا را به پپتیدهایی با وزن مولکولی کمتر از ۱۰ کیلو دالتون هیدرولیز می‌کند. در واقع به دلیل بالا بودن شدت هیدرولیز از وزن مولکولی پروتئین‌ها کاسته می‌شود و در پی آن میزان اسیدهای آمینه آزاد افزایش می‌یابد. در نتیجه می‌توان انتظار داشت که بخش اعظم پروتئین‌های هیدرولیز شده را اسیدهای آمینه آزاد، دی و تری پپتیدها تشکیل دهند. در حالی که فلاورزیم بخش‌های پروتئینی با وزن مولکولی بالا را به پپتیدهایی با وزن مولکولی کمتر از ۵۰ کیلو دالتون هیدرولیز می‌کند. این تفاوت را می‌توان به علت درجه هیدرولیز کمتر فلاورزیم (۱۲/۳۷-۸/٦ درصد) نسبت به آلکالاز (۲۲/۹-۱۹/۲ درصد) دانست. علاوه بر این تراکم باندهای بین ۱۰-۵۰ کیلو دالتون در پروتئین هیدرولیز شده توسط فلاورزیم کمتر از پروتئین حاصل از استخراج قلیایی است و استخراج قلیایی پس از هیدرولیز آنزیمی نیز منجر به کاهش بیشتر تراکم این باندها شده است.



شکل ۳- الگوی الکتروفورز پروتئین‌های استخراج شده به روش‌های قلیایی و آنزیمی

نتایج بسیاری از محققین با نتایج این مطالعه مطابقت دارد. تانگ و همکاران (۲۰۰۳) وزن مولکولی پروتئین‌های هیدرولیز شده سبوس برنج با استفاده از آنزیم‌های پکتیناز و پروتئاز را بین ٦٦/٥-٦/٥ کیلو دالتون گزارش

نمودند. در حالی که ژانگ و همکاران در سال ۲۰۱۲ وزن مولکولی پروتئین‌های سبوس برنج را بین ۰/۱ تا بیش از ۹۷/٤ کیلو دالتون گزارش نمودند.

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که هر دو روش قلیایی و آنزیمی برای استخراج پروتئین از دانه گوجه‌فرنگی امکان‌پذیر و موثر هستند. برای استخراج قلیایی بالاترین راندمان استخراج در pH=۱۲ بدست آمد. در روش آنزیمی، راندمان پروتئین با افزایش غلظت آنزیم از ۱ به ۲ درصد برای هر دو آنزیم افزایش یافته بود. با این حال افزایش غلظت آنزیم برای یک افزایش کوچک در عملکرد پروتئین غیرقابل توجیه به نظر می‌رسد، بنابراین به‌منظور کاهش هزینه‌های مربوط به آنزیم باید غلظت ۱ درصد یا اینکه از آنزیم تثبیت شده برای استفاده مجدد در استخراج پروتئین استفاده شود. علاوه بر این، نوع و غلظت آنزیم و زمان هیدرولیز به‌طور قابل توجهی درجه هیدرولیز را تحت تاثیر قرار می‌دهند. در روش تلفیقی نیز راندمان استخراج و محتوای پروتئین به دلیل حضور ترکیبات غیر پروتئینی نسبت به هیدرولیز آنزیمی به‌تنهایی کاهش یافت. علاوه بر این، به دلیل هیدرولیز و افزایش درجه هیدرولیز، وزن مولکولی پروتئین‌ها کاهش می‌یابد.

منابع مورد استفاده

طالعی ا، صادقی ماهونک ع، قربانی م، جعفری س، اعلمی م، ۱۳۹۰، تاثیر فرآیند حرارتی بر خصوصیات شیمیایی و عملکردی آرد دانه گوجه‌فرنگی، نشریه پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران، ۷(۲)، ۱۰۷-۹۹.

Amza T, Balla A, Tounkara F, Man L and Zhou H, 2013. Effect of hydrolysis time on nutritional, functional and antioxidant properties of protein hydrolysates prepared from gingerbread plum (Neocarya macrophylla) seeds. International Food Research Journal 20(5): 2081-2090.

AOAC, 2002. Association of Official Analytical Chemists of AOAC International. Official Method of Analysis 15th.

Bassler O, Weiss J, Wienkoop S, Lehmann K, Scheler C, Dolle S and Weckwerth W, 2009. Evidence for novel tomato seed allergens: IgE-reactive legumin and vicilin proteins identified by multidimensional protein fractionation-mass spectrometry and in silico epitope modeling. Journal of Proteome Research 8(3): 1111–1122.

Del Valle M, Cámara M and Torija M, 2003. Effect of pomace addition on tomato paste quality. ISHS Acta Horticulturae 613: VIII International Symposium on the Processing Tomato, Istanbul, Turkey: ActaHort CD-rom format only 399-406.

Eggers L, 1975. Some biochemical and electron microscopic studies of the protein present in seed recovered from tomato cannery waste. Dissertation Abstracts International 35(8).

El Nockrashy A and Mukherjee K, 1977. Rapeseed protein isolates by coun- tercurrent extraction and isoelectric precipitation. Journal of Agricultural and Food Chemistry 25: 193–197.

Eromosele C, Arogundade L, Eromosele I and Ademuyiwa O, 2008. Extractability of African yam bean (Sphenostylis stenocarpa) protein in acid, salt and alkaline aqueous media. Food Hydrocolloids 22: 1622-1628.

Ghaly A, Ramakrishnan V, Brooks M and Badge S, 2013. Extraction of Proteins from Mackerel Fish Processing Waste Using Alcalase Enzyme. Journal of Bioprocessing and Biotechniques 3(2).

Klompong V, Benjakul S, Kantachote D and Shahid F, 2007. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (Selaroides leptolepis) as influence by the degree of hydrolysis and enzyme type. Food Chemistry 102: 120–131.

Laemmli U, 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680–685.

Latlief S and Knorr D, 1983. Tomato seed protein concentrates: Effects of methods of recovery upon yield and compositional characteristics. Journal of Food Science 48(6): 1583–1586.

Layne E, 1957. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. Methods in Enzymology 3: 450.

Liadakis G, Tzia C, Oreopoulou V and Thomopoulos C, 1998. Isolation of tomato seed meal proteins with salt solutions. Journal of Food Science 63(3): 450–453.

Muhamyankaka V, Shoemaker C, Nalwoga M and Zhang X, 2013. Physicochemical properties of hydrolysates from enzymatic hydrolysis of pumpkin (Cucurbita moschata) protein meal. International Food Research Journal 20(5): 2227-2240.

Nemati M, Javadian S, Ovissipour M and Keshavarz M, 2012. A Study on the Properties of Alosa (Alosa caspia) By-Products Protein Hydrolysates Using Commercial Enzymes. World Applied Sciences Journal 18(7): 950-956.

Ng KL, 2012. Enzymatic preparation of palm kernel expeller protein hydrolysate. International Food Research Journal 19(2): 721-725.

Ovissipour M, Abedian A, Motamedzadegan A, Rasco B, Safari R and Shahiri H, 2009. The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from the Persian sturgeon (Acipenser persicus) viscera. Food Chemistry 115: 238–242.

Quaglia GB and Orban E, 1990. Influence of enzymatic hydrolysis on structure and emulsifying properties of sardine (Sardina pilchardus) protein hydrolysates. Journal of Food Science 55(6): 1571-1573.

Rondel C, Portet B, Alric I, Mouloungui Z, Blanco JF and Silvestre F, 2011. Green Production of Anionic Surfactant Obtained from Pea Protein. Journal of Surfactants and Detergents 14(4): 535-544.

Ruiz Celma A, Cuadros F and López-Rodríguez F, 2009. Characterisation of industrial tomato by-products from infrared drying process. Food and Bioproducts Processing 87(4): 282–291.

Sagiroglu A and Ozcan H, 2009. Functional and biochemical properties of proteins from safflower seed. Preparative Biochemistry and Biotechnology 39: 159–169.

Sathivel S, Bechtel P, Babbitt J, Smiley S, Crapo C, Reppond K and Prinyawiwatkul W, 2003. Biochemical and functional properties of Herring (Clupea harengus) byproduct hydrolysates. Journal of Food Chemistry and Toxicology 68: 2196-2200.

Schwass D and Finley J, 1984. Heat and alkaline damage to proteins: racemization and lysinoalanine formation. Journal of Agricultural and Food Chemistry 32: 1377–1382.

Selling G, Hojilla-Evangelista M, Evangelistab R, Isbell T, Price N and Doll K, 2013. Extraction of proteins from pennycress seeds and press cake. Industrial Crops and Products 41: 113– 119.

Shao D, G. Atungulu G, Pan Z, Yue T, Zhang A and Fan Z, 2013. Characteristics of isolation and functionality of protein from tomato pomace produced with different industrial processing methods. Food and Bioprocess Technology doi:10.1007/s11947-013-1057-0.

Shen L, Wang X, Wang Z, Wu Y and Chen J, 2008. Studies on tea protein extraction using alkaline and enzyme methods. Food Chemistry 107(2): 929-938.

Soetrisno U and Holmes Z, 1992. Protein yields and characteristics from acid and salt coagulations of yellow pea (Pisum sativum l miranda) flour extractions. Journal of Agricultural and Food Chemistry 40: 970–974.

Tang S, Hettiarachchy N, Horax R and Eswaranandam S, 2003. Physicochemical properties and functionality of rice bran protein hydrolyzate prepared from heat-stabilized defatted rice bran with the aid of enzymes. Journal of Food Science 68(1): 152–157.

Zhang H, Zhang HJ, Wang L and Guo XN, 2012. Preparation and functional properties of rice bran proteins from heat-stabilized defatted rice bran. Food Research International 47: 359–363.

Zhang T, Jiang B and Wang Z, 2007. Gelation properties of chickpea protein isolates. Food Hydrocolloids 21(2): 280–286.

Zhao Q, Xiong H, Selomulya C, Chen X, Zhong H, Wang S and Zhou Q, 2012. Enzymatic hydrolysis of rice dreg protein: Effects of enzyme type on the functional properties and antioxidant activities of recovered proteins. Food Chemistry 134: 1360–1367.

Comparison of enzymatic and alkaline treatment on hydrolysis yield and properties of tomato seed protein

M Amiri Andy[1*], A Motamedzadegan[2] and S H Hosseini-Parvar[3]

Received: September 21, 2015 Accepted: December 05, 2015

[1]MSc, Department of Food Science and Technology, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran
[2]Associate Professor and Assistant Professor, respectively, Department of Food Science and Technology, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran
[*]Corresponding author: E mail: masoumehamiri@yahoo.com

Abstract
In this study, yield, purity, degree of hydrolysis and molecular weight of protein produced by hydrolyzation of tomato seed using alkali at pH=10, 11 and 12, enzymatic extraction by Alcalase 2.4L and Flavourzyme 500L at concentration of 1 and 2%, and the combination of enzymatic and alkaline extraction were evaluated. The results showed that extraction yield of Alcalase- hydrolyzed protein was significantly higher than those for others ($p<0.05$), but no significant difference in the purity of protein with proteins from alkaline extraction ($p>0.05$). However, it was found that alkaline treatment after enzymatic hydrolysis leads to decrease in purity of protein and extraction yield, compared to single treatment with enzyme. By the way, molecular weight of protein hydrolysates decreased proportional to extend of enzymatic treatment. Therefore, protein hydrolysate from Alcalase had peptides lower than 10 kDa due to the higher degree of hydrolysis. In general, protein extraction was influenced by pH, the type and concentration of enzyme that was used.

Keywords: Alkaline extraction, Enzymatic hydrolysis, Protein, Tomato seed