

بررسی خصوصیات تغذیه‌ای ایزوله پروتئینی دانه کدوی تخم کاغذی

سیده نرگس مظلومی^{۱*}، علیرضا صادقی ماهونک^۲

۱- دانشجوی دکتری دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۲- دانشیار دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

(تاریخ دریافت: ۹۴/۰۶/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۲/۲۴)

چکیده

هر ساله بخش قابل توجهی از فرآورده‌های روغنی، از محصولات گیاهی به دست می‌آیند. طی این فرآوری‌ها، مقدار زیادی کنجاله تولید می‌گردد که دفع این تفاله‌ها از نظر اقتصادی و زیست محیطی هزینه‌بر و مشکل‌ساز است. از آنجایی که کنجاله‌های تولیدی از نظر پروتئین بسیار غنی می‌باشند؛ لذا در این تحقیق، استخراج پروتئین از تفاله روغن‌کشی شده کدو مورد بررسی قرار گرفت و سپس خصوصیات تغذیه‌ای ایزوله پروتئینی حاصل بررسی شد. ابتدا الگوی حلالیت پروتئین در ۱۲-۱ pH تعیین گردید سپس اثر غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵ و ۱ مولار نمک کلرید سدیم در pHهای ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲ بررسی شد. سپس ایزوله پروتئینی کدو با استفاده از استخراج قلیایی و ترسیب در نقطه ایزوالکتریک تهیه شد. ترکیبات شیمیایی (پروتئین، چربی، رطوبت، خاکستر و کربوهیدرات)، کنجاله چربی‌گیری شده اولیه و ایزوله پروتئینی، وزن مولکولی پروتئین و ویژگی‌های تغذیه‌ای ایزوله حاصله نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که حلالیت پروتئین در pH اسیدی کمتر بوده و در نقطه ایزوالکتریک به حداقل می‌رسد. اما در pH قلیایی افزایش یافته و در pH= ۱۰ به حداکثر رسید. تاثیر غلظت نمک بر حلالیت پروتئین در سطح ۵٪ معنی‌دار بود ($P < 0/05$) و افزایش نمک اثر عکس در حلالیت پروتئین داشت. ایزوله کدو از ارزش تغذیه‌ای بالایی نیز برخوردار بود و منبع مناسبی از اسیدهای آمینه ضروری می‌باشد. با توجه به بالا بودن درصد پروتئین ایزوله کدو و همچنین ویژگی‌های تغذیه‌ای خوب این نوع پروتئین، می‌توان از آن در فرمولاسیون‌های مواد غذایی مختلف استفاده کرد.

کلید واژگان: کنجاله، ایزوله پروتئینی، حلالیت، ارزش تغذیه‌ای

* مسئول مکاتبات: samira.mazloomi@yahoo.com

۱- مقدمه

با توجه به رشد سریع جمعیت جهان، امروزه تقاضا برای مصرف غذاهای پروتئینی رو به افزایش است. از آنجا که پروتئین‌های حیوانی هزینه بالایی دارند و در تمام کشورها به اندازه کافی در دسترس نمی‌باشند، بنابراین در سال‌های اخیر توجه بیشتری به پروتئین‌های گیاهی به‌عنوان جایگزین‌های جدید و منابع ارزان قیمت پروتئین با کیفیت مناسب شده است. هر ساله بخش قابل توجهی از فرآورده‌های روغنی، از محصولات گیاهی به‌دست می‌آیند. طی این فرآوری‌ها، مقدار زیادی کنجاله تولید می‌گردد که دفع این تفاله‌ها از نظر اقتصادی و زیست محیطی هزینه‌بر و مشکل‌ساز است.

کدو متعلق به خانواده *Cucurbitaceae* می‌باشد. در میان این خانواده، کدوی تخم کاغذی با نام علمی *Cucurbita pepo*، بیشترین تنوع را دارد. داخل هر میوه ۴۰۰ تا ۵۰۰ عدد تخم کدو، که معادل ۱۵۰ تا ۲۰۰ گرم می‌باشد، قرار گرفته است. این دانه‌ها به رنگ سبزینه یا زیتونی مشاهده می‌شوند [۱]. این دانه‌ها از نظر منبع روغن بسیار غنی می‌باشد و این منبع روغنی می‌تواند جایگزین سایر روغن‌های خوراکی از جمله روغن سویا، روغن پنبه دانه و روغن ذرت شود [۲]. تحقیقات نشان داد دانه‌های این گیاه و روغن حاصل از آن حاوی مواد موثره ارزشمندی است که نقش عمده‌ای در معالجه غده پروستات و مداوای سوزش مجاری ادراری و معالجه تصلب شرایین دارند. مصرف این دانه‌ها سبب افزایش مقاومت بدن در برابر عوامل بیماری‌زا می‌شود. روغن تخم کدو در علم پزشکی کشورهایی نظیر چین، هند، آرژانتین، مکزیک، برزیل و آمریکا برای درمان اختلالات غده پروستات و مثانه مورد استفاده قرار می‌گیرد. نتایج حاصل از تحقیقات انجام گرفته‌شده حاکی از آن است که روغن موجود در دانه کدو فاقد کلسترول بوده و سرشار از اسیدهای ω۹ و ω۶ می‌باشد و در تسکین درد مفاصل مخصوصا در شرایط مزمن، موثر واقع می‌شوند [۳]. روغن تخم کدو به‌عنوان روغن پخت و پز در بسیاری از کشورهای آفریقایی و شرق میانه و نیز به‌عنوان روغن سالاد در جنوب استرالیا و مناطق نزدیک اسلوونی و مجارستان مورد استفاده قرار می‌گیرد [۴]. در طی مصرف کدو و فرایندهای انجام

شده بر آن، ضایعات زیادی از جمله پوسته کدو و تخم کدو به‌دست می‌آید که این ضایعات دارای مصارف تغذیه‌ای و دارویی می‌باشند [۵].

پروتئین‌های موجود در دانه کدو نیز از تکثیر تومورهای پوستی جلوگیری می‌کنند و محتوی اسیدهای آمینه با ارزش تغذیه‌ای بالایی می‌باشند [۶]. با توجه به ارزش تغذیه‌ای بالای تخم کدو، می‌توان از این ماده به‌عنوان یک منبع مناسبی از پروتئین و مواد مغذی در محصولات غذایی مختلف استفاده نمود و ضایعات تولیدی حاصل را به حداقل میزان رسانید [۷]. آرد کنجاله تخم کدو از ورقه‌های دانه کدو با خارج‌سازی بیشتر روغن آن به‌دست می‌آید که خود پایه بیشتر محصولات پروتئین کدو می‌باشد و حاوی حداقل ۵۰ درصد پروتئین بر پایه وزن مرطوب است [۸].

استفاده از پروتئین‌های گیاهی به‌خصوص پروتئین‌های نشات گرفته از دانه‌های روغنی و غلات به‌طور قابل ملاحظه‌ای در چند دهه اخیر افزایش یافته است. این دسته از پروتئین‌ها، به‌عنوان جایگزین پروتئین‌های حیوانی مطرح بوده و به دلیل داشتن خواص عملکردی مناسب و ترکیبات زیست فعال، نه تنها در مواد غذایی بلکه در مواد آرایشی و داروسازی نیز قابل استفاده هستند و نقش مهمی در تغذیه انسان دارند [۹]. پروتئین‌های گیاهی معمولا به‌شکل کنسانتره پروتئینی یا ایزوله پروتئینی عرضه می‌شوند، تفاوت این دو محصول پروتئینی را می‌توان به میزان پروتئین موجود در هر محصول نسبت داد که این مقدار در کنسانتره پروتئینی حدود ۶۵٪ و در ایزوله پروتئینی بالای ۸۰٪ بر اساس وزن خشک می‌باشد [۱۰].

هزینه گزاف و منابع محدود پروتئین‌های حیوانی، زمینه را جهت انجام پژوهش‌های گسترده به‌منظور یافتن جایگزینی مناسب برای پروتئین‌های حیوانی و استفاده از منابع ارزان و در دسترس پروتئین‌های گیاهی فراهم آورده است. بنابراین در این پژوهش کنجاله کدو با توجه به بالا بودن میزان پروتئین آن مورد توجه قرار گرفته است و تحقیقاتی در زمینه بهینه‌سازی شرایط استخراج پروتئین و نیز بررسی خصوصیات عملکردی و تغذیه‌ای پروتئین استخراج شده انجام شده است.

۲- مواد و روش

کنجاله کدو *Cucurbita pepo con. Pepo var. Styriaca* از کارخانه روغن‌کشی سویابین شهرستان گرگان تهیه گردید. کنجاله‌ها در کیسه‌های پلاستیکی غیر قابل نفوذ بسته بندی و تا زمان انجام آزمایش‌ها در دمای یخچال نگهداری شدند. اسید کلریدریک، اسید سولفوریک، اسید بوریک، اتانول، دی اتیل اتر، اسید استیک، هگزان، اکریل آمید، بتامرکاپتاتانول، N، N متیل بیس اکریل آمید، سدیم دودسیل سولفات (SDS)،^۱ کوماسی بریلیانت بلو R250، برموفنل بلو، گلیسین مخصوص الکتروفورز، پروتئین‌های نشانگر طیف گسترده^۲، تریس^۳، متانول، هیدروکسید سدیم، کاتالیزور کلدال و آب مقطر. تمامی مواد شیمیایی و حلال‌های مورد استفاده در این پژوهش از شرکت‌های معتبر و با درجه خلوص بالا خریداری شدند.

۲-۱- آماده سازی نمونه

۲-۱-۱ روغن‌گیری

پس از حذف مواد خارجی، کنجاله توسط دستگاه آسیاب (Perten, 3100 ساخت کشور آلمان)، به آرد تبدیل و از الک با مش ۳۰^۴ عبور داده شد.

به منظور گرفتن روغن از کنجاله تخم کدو، به نسبت ۱ به ۳ هگزان نرمال به نمونه‌ها افزوده و نمونه‌ها در ظروف درب‌دار نگهداری شدند. فرایند روغن‌گیری به مدت ۱۶ ساعت انجام شد و سوسپانسیون‌های حاصل در فواصل زمانی نیم ساعت، هم زده شدند. سپس آردها در معرض هوای آزاد در دمای محیط قرار گرفتند تا حلال اضافی با جریان هوا خارج شود. در نهایت کنجاله چربی گرفته در کیسه‌های پلاستیکی به وزن یک کیلوگرم قرار داده و در یخچال نگهداری شدند [۱۱].

۲-۱-۲ تهیه آرد کنجاله کدو

کنجاله‌های چربی گرفته در این مرحله توسط آسیاب آزمایشگاهی (Perten, 3100 آلمان) در آزمایشگاه تجزیه مواد غذایی، آسیاب شدند به طوری که ذرات آرد شده بتوانند از الک با مش ۷۰ عبور

کنند. نمونه‌ها در کیسه‌های پلی اتیلنی با درب بسته در شرایط دمایی یخچال نگهداری شدند [۱۲].

۲-۱-۳ تعیین الگوی حلالیت پروتئین کنجاله کدو

حلالیت پروتئین کنجاله کدو چربی گیری شده مطابق روش کنیسلا و همکاران (۱۹۷۶) با اندکی تغییرات بررسی شد. به منظور تعیین الگوی حلالیت، سوسپانسیون‌هایی از کنجاله چربی گرفته در آب مقطر با نسبت (۲۰:۱ حجمی در حجمی) تهیه شد [۱۳]. سوسپانسیون حاصل به مدت یک ساعت در دمای اتاق مخلوط، سپس pH سوسپانسیون توسط سود و اسید کلریدریک یک نرمال در ۱۲ سطح (۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲) تنظیم و به مدت ۳۰ دقیقه در pH ثابت مخلوط شد. سوسپانسیون حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی-گراد و دور ۶۰۰۰ آرپی ام توسط سانتریفیوژ یخچال‌دار (Hanil, combi 514R سانتریفیوژ شده و سوپرناتانت حاصل جدا شد. مقدار پروتئین خام در سوپرناتانت مطابق روش کلدال AOAC (۲۰۰۵) اندازه گیری شد. حلالیت معرف میزان پروتئینی است که در جزء محلول پروتئین قرار دارد (فاکتور پروتئین ۶/۲۵ در نظر گرفته شد) [۱۴].

معادله (۱-۲)

$$\text{پروتئین موجود در سوپرناتانت} \times 100 = \frac{\text{پروتئین موجود در آرد}}{\text{حلالیت (\%)}}$$

هم‌چنین با توجه به روش‌های استخراج پروتئین ذکر شده در مطالعات مختلف، به منظور بررسی اثر متقابل غلظت نمک و pH بر روی حلالیت پروتئین کنجاله کدو، سوسپانسیونی از آرد چربی گرفته کنجاله کدو در غلظت‌های مختلف نمک (۰/۱، ۰/۵، ۱، ۱/۰، ۱/۰، ۱/۰) تهیه و برای هر غلظت نمک، pH در سطوح ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲ که مطابق آزمون‌های انجام شده در محدوده حداکثر حلالیت قرار داشت، تنظیم شده و مراحل قبل تکرار شد.

۲-۱-۴ استخراج پروتئین و تهیه ایزوله پروتئین دانه کدو

تهیه ایزوله پروتئین کدو مطابق روش هرکس و همکاران (۲۰۱۰) انجام گرفت [۱۵]. آرد کنجاله به نسبت ۱:۲۰ با آب مقطر مخلوط شد و در دمای محیط با سدیم هیدروکسید یک نرمال به حداکثر pH حلالیت رسانده شد. نمونه حاصل به مدت یک ساعت در

1. Sodium Dodecyl Sulfate
2. Wide range marker
3. Tris
4. Mesh

اسیدآمینها می‌باشد. مقادیر آن اگر بیش از ۱۰۰ باشد، به عدد ۱۰۰ گرد می‌شوند. امتیاز اسیدآمینها از رابطه زیر محاسبه می‌شود.
(معادله ۲-۲)

$$\text{امتیاز} = \frac{\text{میلی گرم اسیدآمینها در ۱ گرم از پروتئین مورد آزمایش}}{\text{میلی گرم اسیدآمینها در ۱ گرم از پروتئین مرجع}} \times 100$$

۲-۴-۲ ارزش شیمیایی پروتئین^۶

امتیاز شیمیایی با در نظر گرفتن مقدار پروتئین موجود در تخم مرغ و بر اساس رابطه زیر محاسبه شد [۱۹].
(معادله ۳-۲)

$$\text{امتیاز شیمیایی} = \frac{\text{مقدار کل اسیدآمینها ضروری تخم مرغ (گرم)}}{\text{مقدار اسیدآمینها ضروری تخم مرغ (گرم)}} \times$$

$$\frac{\text{مقدار اسیدآمینها ضروری در پروتئین مورد بررسی (گرم)}}{\text{مقدار کل اسیدآمینها ضروری در پروتئین مورد بررسی (گرم)}} \times 100$$

۲-۴-۳ شاخص تغذیه‌ای^۷

شاخص تغذیه‌ای از رابطه زیر به دست می‌آید [۲۰].
(معادله ۴-۲)

$$\text{شاخص تغذیه ای} = \frac{\text{درصد پروتئین} \times \text{شاخص اسید آمینه ضروری}}{100}$$

۲-۴-۴ ارزش بیولوژیک

ارزش بیولوژیک با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد [۱۸].
(معادله ۵-۲)

دمای محیط مخلوط و در ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۶۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سوپرناتانت حاصل جداسازی شده و با اسیدکلریدریک ۱ نرمال به نقطه ایزوالکتریک (pH=۳/۴۹) رسانده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط قرار گرفت. سوسپانسیون حاصل در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و ۶۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوبات حاصل با ۲۰ میلی لیتر آب مقطر شستشو و توسط خشک کن انجمادی (مدل FD₄، سازنده شرکت اپرون کره جنوبی) خشک شدند.

۲-۲-۲ آزمون‌های شیمیایی

اندازه گیری پروتئین به روش کج‌دال، فیبرخام، رطوبت، خاکستر و چربی ایزوله حاصله، مطابق استاندارد AOAC انجام گرفت [۱۴]. اندازه گیری‌ها در سه تکرار انجام شد.

۲-۳-۲ الکتروفورز پروتئین

الکتروفورز آرد کنجاله کدو، ایزوله پروتئین ایزوله کدو با ژل SDS-PAGE بر طبق روش لاملی (۱۹۷۰) با اندکی تغییرات انجام شد [۱۶].

در این روش از ژل متراکم کننده ۵ درصد و ژل جد اکننده ۱۲ درصد استفاده شد. پس از اتمام زمان عبور نمونه‌ها در ژل، ژل مربوطه در محلول رنگ آمیزی حاوی ۱۰ درصد اسید استیک، ۵۰ درصد متانول و ۰/۱ درصد کوماسین برلیانت بلو R قرار گرفت. سپس مرحله رنگبری با محلول رنگ بر (۱۰ درصد استیک اسید و ۷/۵ درصد متانول) انجام شد.

۲-۴-۴ اندازه‌گیری خواص تغذیه‌ای

انجام آزمون آنالیز اسید آمینه طبق روش مور و استین (۱۹۶۳) تحت شرایط دمایی ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۴ ساعت و در حضور اسید کلریدریک ۶ مولار انجام شد [۱۷].
نوع ستون‌های مورد استفاده در این آزمون RP C-18 با اندازه (۱۵×۰/۴۶Cm) میکرومتر بوده است.

۲-۴-۱ شاخص اسیدهای آمینه ضروری^۵

شاخص اسیدآمینها ضروری بر اساس روش اوسر (۱۹۹۵) انجام شد [۱۸]. شاخص اسیدآمینها ضروری معنای هندسی ارزش هر یک از اسیدآمینها بوده و برابر با آنتی لگاریتم هر یک از امتیاز

6. Chemical Score
7. Nutritional index

5. EAAI: Essential Amino Acid Index

۷/۱۱ - (شاخص اسید آمینه ضروری نمونه) $1/09 \times$ = ارزش بیولوژیک

۲-۵- آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از طرح کاملاً تصادفی با نرم افزار SPSS انجام شد. مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمالی ۵ درصد انجام گرفت.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- حلالیت پروتئین کنجاله دانه کدو

الگوی حلالیت پروتئین کنجاله کدو در شکل ۱ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود بیشترین و کمترین میزان حلالیت پروتئین به ترتیب در pH های ۱۰ و ۳/۴۹- مشاهده شد. حلالیت در مقادیر pH های اسیدی (pH های ۱ و ۲ و ۳) تا نقطه ایزوالکتریک (pH=۳/۴۹) کاهش یافت، سپس در pH های بالای نقطه ایزوالکتریک، حلالیت افزایش یافت و در pH= ۱۰ به حداکثر مقدار خود رسید، پس از آن کمی کاهش نشان داد و سپس مجدداً افزایش یافت. نتایج تجزیه و تحلیل آماری نشان داد بین حلالیت در pH های مختلف، در سطح ۵ درصد اختلاف معنی دار وجود دارد ($P < 0/05$). به‌طور کلی بیشترین حلالیت در pH قلیایی و کمترین حلالیت در pH اسیدی (اطراف نقطه ایزوالکتریک) مشاهده شد. علت این پدیده آن است که پروتئین‌ها زمانی به صورت محلول می‌باشند که دافعه الکترواستاتیکی بین پروتئین‌ها بیش از واکنش‌های آبریزی باشد. در نقطه ایزوالکتریک، پروتئین‌ها بدون بار می‌باشند، نیروهای جاذبه غالب بوده و مولکول‌ها تمایل به تجمع دارند که نتیجه آن عدم حلالیت و رسوب پروتئین می‌باشد. در بالای نقطه ایزوالکتریک، بار خالص منفی بوده و به علت افزایش دافعه الکترواستاتیک بین پروتئین‌ها، حلالیت نیز افزایش می‌یابد. به‌طور کلی از محدوده pH ایزوالکتریک، به سمت pH های بالاتر، میزان حلالیت افزایش یافت. این رفتار مشابه با بسیاری از گزارش‌های پیرامون حلالیت پروتئین گیاهان مختلف می‌باشد [۲۱]. زایاس (۱۹۹۷) محدوده pH=۴-۵ را برای اکثر گیاهان محدوده ایزوالکتریک دانست [۲۲]. در نقطه ایزوالکتریک پروتئین‌ها بدون بار می‌باشند،

نیروهای جاذبه غالب بوده و مولکول‌ها تمایل به تجمع دارند که نتیجه آن عدم حلالیت می‌باشد. در بالای نقطه ایزوالکتریک، بار خالص منفی بوده و به علت دافعه الکترواستاتیک بین پروتئین‌ها، حلالیت افزایش می‌یابد. [۲۳ و ۲۱]. لیزاس (۱۹۹۲) براساس مطالعه‌ای که قبلاً بر آرد کنجاله کدو (*Cucurbita maxima*) انجام داده بود، کمترین حلالیت پروتئین را در محدوده pH های ۳ تا ۷ معرفی کرد [۲۴].

میزان حلالیت آرد دانه کدو مورد استفاده در این پژوهش که بومی ایران است، در مقایسه با آرد آرد نخود و باقلا [۲۵]، شبلیله [۲۶]، آردهای لوبیا قرمز، لوبیا چیتی، عدس و نخود [۲۷]، بیشتر بود.

به‌طور کلی هر قدر میزان حلالیت پروتئین آرد بیشتر باشد، قابلیت تلفیق و ادغام آن با مواد غذایی بیشتر و راحت‌تر و ارزش غذایی آن‌ها بیشتر خواهد شد، ولی تا حدی قابلیت تشکیل ژل، چسبندگی و امولسیون کنندگی آن‌ها کمتر می‌گردد [۲۸].

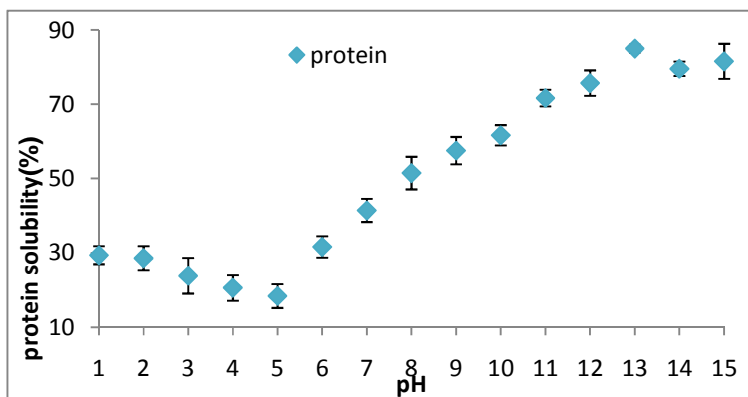


Fig 1 protein solubility of the pumpkin cake

به‌منظور مقایسه اثر pH و غلظت‌های مختلف نمک بر میزان حلالیت پروتئین کنجاله کدو و تعیین بهترین ترکیب pH و غلظت نمک برای استخراج پروتئین از کنجاله کدو، حلالیت پروتئین در pH ۸-۱۲ (محدوده حداکثر حلالیت) و غلظت‌های مختلف نمک (۰، ۰/۱، ۰/۵، ۱ مولار) بررسی و بهترین ترکیب pH و غلظت نمک برای استخراج پروتئین از کنجاله کدو تعیین

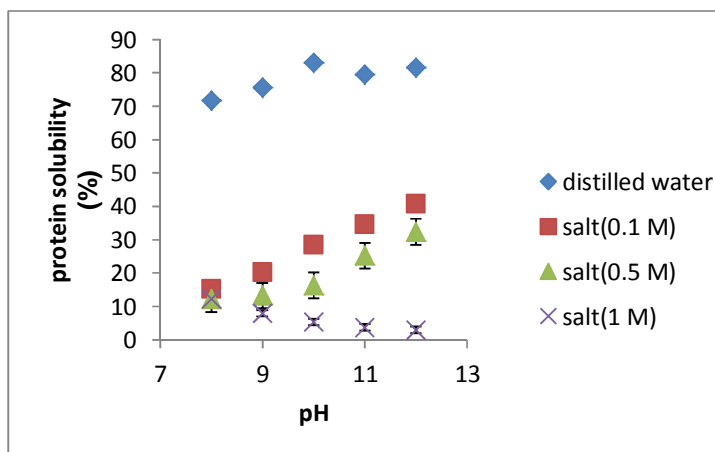


Fig 2 The interaction between pH and salt concentration on the solubility of protein

نتایج نشان داد که عمل چربی گیری موجب کاهش قابل ملاحظه در چربی ایزوله پروتئین شد (۱۰/۳۲٪ به ۱/۷۹٪). محتوای پروتئین آرد کنجاله اولیه ۴۸/۵۷٪ بود، در حالی که ایزوله پروتئین به دست آمده دارای ۸۷/۵۵٪ پروتئین بود. لیزاس (۱۹۹۲) و ال ادوای و تاها (۲۰۰۱)، نیز به نتایج مشابهی در رابطه با ترکیبات شیمیایی کنجاله چربی گیری شده دانه کدو دست یافتند [۳۳ و ۸]. این نتایج حاکی از این موضوع است که میزان پروتئین آرد دانه کدو در مقایسه با آرد سویا کم چرب [۳۴]، آرد شنبلیله [۲۶]، آرد لوبیا قرمز، لوبیا چیتی، عدس و نخود [۲۷] بیشتر می‌باشد.

گردید. اثر متقابل pH و نمک بر روی الگوی حلالیت پروتئین کنجاله کدو در شکل ۳-۲ نشان داده شده است. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری نشان داد، بین مقادیر حلالیت در pH و غلظت‌های مختلف نمک در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P < 0/05$). همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، بیشترین میزان حلالیت پروتئین در غلظت صفر مولار نمک و pH برابر ۱۰ مشاهده شد. نتایج مطالعات نشان داد که حلالیت پروتئین کنجاله کدو در pHهای قلیایی با افزودن نمک، کاهش یافته و رابطه عکس داشت، به نحوی که با افزودن نمک در این pH، مقدار بیشتری از آب موجود با یون‌های نمک اتصال برقرار کرده که این امر سبب آزدایی پروتئین‌ها و راسب شدن پروتئین‌ها توسط نمک و در نتیجه کاهش ظرفیت جذب آب و به دنبال آن کاهش حلالیت پروتئین شد [۲۹].

لیزاس (۱۹۹۲) نیز به نتایج مشابهی در رابطه با تاثیر غلظت‌های مختلف نمک بر حلالیت پروتئین کنجاله کدو (*Cucurbita maxima*)، در pHهای قلیایی دست یافت [۸]. شن (۱۹۷۶) برای ایزوله پروتئین سویا [۳۰]، بیلگی و سلیک (۲۰۰۴) برای کنسانتره پروتئین جو [۳۱]، یالسن و سلیک (۲۰۰۷) برای جو [۳۲]، به نتایج مشابهی در این زمینه دست یافتند.

۳-۲- ترکیب شیمیایی

محتوای رطوبت، خاکستر، چربی، پروتئین و کربوهیدرات آرد کنجاله اولیه روغن گیری شده و ایزوله پروتئین دانه کدو در جدول ۱ آورده شده است.

Table 1 chemical characteristics of the pumpkin cake and protein isolate

protein isolate	pumpkin cake	
87/55 ± 1/41	48/57 ± 3/51	(N×6/25) Protein
1/79 ± 0/15	10/32 ± 0/58	Fat
1/01 ± 0/17	4/24 ± 0/52	Moisture
1/6 ± 0/23	6/045 ± 0/17	Ash
8/05	30/825	Carbohydrates (difference from other compounds)

*The numbers are based on dry weight

Average triplicate

*Standard deviation ±

الگوی SDS-PAGE نمونه‌های کنجاله چربی‌گیری شده و ایزوله پروتئین دانه کدو در شکل ۳ نشان داده شده است.

۳-۳- الگوی الکتروفورز

کیلودالتون بیشتر از سایر باندهای پپتیدی بود و علاوه بر این، دو باند پلی پپتیدی نیز در محدوده ۳۲-۲۴ کیلودالتون مشاهده گردید.

الگوی SDS-PAGE نمونه ایزوله پروتئین دانه کدو تقریباً مشابه الگوی الکتروفورزی آرد چربی گیری شده دانه کدو بود، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که در روش استخراج قلیایی و ترسیب اسیدی، اکثر جزءهای پروتئینی در کنجاله دانه کدو قابل استخراج می‌باشند.

همانطور که مشاهده می‌شود حدود ۱۱ باند پلی پپتیدی بر اساس وزن مولکولی برای آرد روغن‌گیری شده کدو جدا شده اند: ۱۳، ۱۱۵، ۸۰، ۴۲، ۳۲، ۲۴، ۱۷، ۱۵ کیلو دالتون. تعداد باندهای با وزن مولکولی ۳۲ و ۴۲ کیلودالتون بیشتر از سایر باندهای پپتیدی بود و یک باند پلی پپتیدی نیز در محدوده ۳۲-۲۴ کیلودالتون مشاهده شد.

توزیع زیر واحدهای پروتئین برای ایزوله پروتئینی کدو کمی وسیع‌تر از آرد چربی گیری شده کدو بود و این باندهای پلی پپتیدی دارای وزن مولکولی ۱۱۵، ۸۰، ۶۱، ۵۲، ۴۲، ۳۲، ۱۷، ۱۵ و ۱۱ کیلودالتون بودند و تعداد باندهای با وزن مولکولی ۱۱۵ و ۴۲

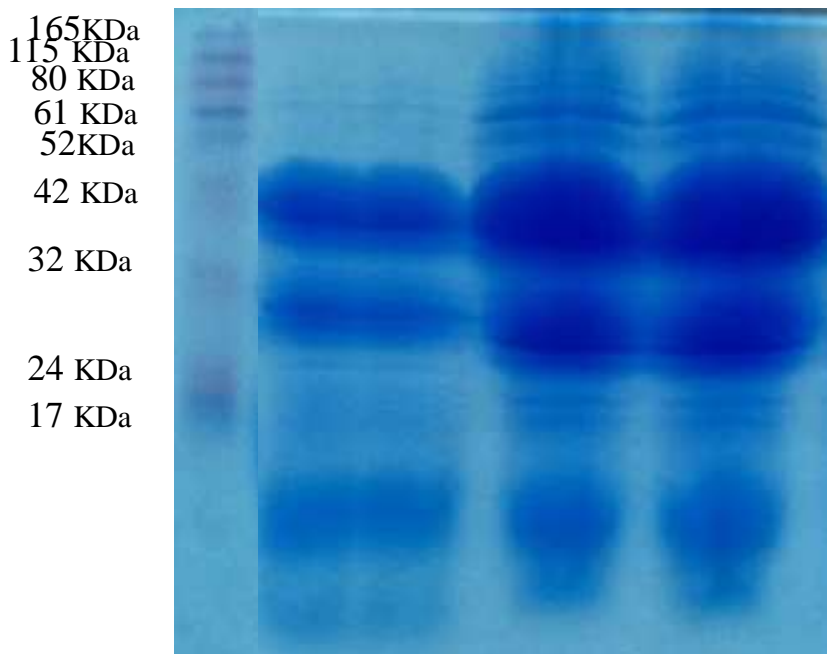


Fig 3 Pattern SDS-PAGE meal and protein isolate samples of pumpkin seeds.

*sequence Protein from left to right: Marker, the flour of the pumpkin cake, the flour of the pumpkin cake, protein isolate pumpkin, protein isolate pumpkin

اینکه میزان اسیدآمینه هیستدین آرد پروتئینی دانه کدو نسبت به سایر اسیدهای آمینه موجود در آرد کمتر می‌باشد، اما این مقدار در حد مورد نیاز بدن (۱/۷ گرم / ۱۰۰ گرم پروتئین) کافی می‌باشد.

۳-۴- خواص تغذیه‌ای

۳-۴-۱- آنالیز ترکیب اسیدهای آمینه

میزان اسید آمینه آرد ایزوله دانه کدو بر مبنای گرم در ۱۰۰ گرم پروتئین در جدول ۲ بیان شده است. طبق جدول با وجود

Table 2 Amino acids in pumpkin seed protein isolate (grams per 100 grams protein)

Amino acids with acidic side chain	
7/049	Aspartic acid
13/643	Glutamic acid
20/692	Total this group
Amino acids with alkaline side chain	
1/772	Histidine
2/730	Lysine
2/575	Arginine
7/077	Total this group
Amino acids with polar side chains	
2/889	Serine
4/417	Threonine
3/383	Tyrosine
10/991	Total this group
Amino acids with nonpolar side chains	
3/046	Alanine
3/344	Valine
7/121	Leucine
2/722	Isoleucine
4/029	Glycine
4/284	Phenylalanine
3/143	Methionine
25/689	Total this group

۳-۴-۲- شاخص اسیدهای آمینه ضروری

شاخص اسیدهای آمینه ضروری بین ۱۰۰ و ۱ تعیین می‌گردد. زمانی که برابر یا مساوی ۹۰ باشد به عنوان یک منبع

پروتئینی خوب عمل می‌کند، زمانی که حدود ۸۰ باشد، منبع پروتئینی مفید بوده و با کاهش این شاخص به مقادیر کمتر از ۷۰ به‌عنوان یک منبع ناکافی قلمداد می‌شود [۳۵].

Table 3 The essential amino acids index

The essential amino acid	
55/46	Valine
50/20	Isoleucine
35/45	Lysine
100	Threonine
100	Tyrosine + Phenylalanine
73/41	Leucine
100	Methionine + cysteine

۳-۴-۳- ارزش شیمیایی

در سنجش شاخص شیمیایی، اسیدآمینه‌های ضروری پروتئین تخم مرغ باید به عنوان مرجع در نظر گرفته شود. طبق جدول ۴ اسیدآمینه لیزین برای نمونه ایزوله پروتئین دانه کدو به عنوان اسیدآمینه محدود کننده مشخص شده است. بنابراین شاخص شیمیایی آرد ایزوله دانه کدو برابر ۶۱/۳۹ محاسبه شده است. بصیری (۱۳۹۰) ارزش شیمیایی آرد و ایزوله پروتئین سویا را به ترتیب برابر ۴۱/۵ و ۴۲/۴ گزارش کرد [۳۴].

با توجه به داده‌های جمع آوری شده در جدول ۳ آرد ایزوله پروتئینی دانه کدو منبع مناسبی از اسیدآمینه‌های ضروری ترئونین، تیروزین و فنیل آلانین، لوسین و سیستئین و متیونین می‌باشد و در عین حال منبع ناکافی از نظر اسیدآمینه‌های لایزین، والین و ایزولوسین می‌باشد. این ایزوله بر خلاف ایزوله سویا منبع غنی از اسیدآمینه‌های گوگرد دار می‌باشد. شاخص اسیدآمینه ضروری ایزوله کدو که برابر آنتی لگاریتم مجموع ۹ اسیدآمینه ضروری آن می‌باشد، معادل ۷۱/۸۶ می‌باشد. بصیری (۱۳۹۰) شاخص اسید آمینه ضروری آرد و ایزوله پروتئین سویا را به ترتیب برابر ۸۰/۷۲ و ۷۳/۶۲ گزارش کرد [۳۴].

Table 4 Chemical index of essential amino acids

The essential amino acid	
79/75	Valine
79/43	Isoleucine
61/39	Lysine
158/04	Threonine
135/51	Tyrosine + Phenylalanine
88/79	Leucine
129/71	Methionine + cysteine

۳-۴-۴- شاخص تغذیه‌ای

با توجه به فرمول مربوطه، شاخص تغذیه‌ای آرد ایزوله پروتئین دانه کدو برابر با ۶۲/۹۱ می‌باشد. بصیری (۱۳۹۰) شاخص تغذیه‌ای آرد و ایزوله پروتئین سویا را به ترتیب برابر ۳۸/۱۷ و ۶۹/۹۴ گزارش کرد [۳۴].

۳-۴-۵- ارزش بیولوژیکی

ارزش بیولوژیکی فاکتور دیگری است که در رابطه با ارزش تغذیه‌ای پروتئین‌ها به کار می‌رود. در آزمایش صورت گرفته، ارزش بیولوژیک ایزوله پروتئین دانه کدو برابر با ۷۱/۲۱ بود. بنابر سایر آزمایشات انجام شده ارزش بیولوژیکی آب پنیر برابر با ۱۰۴، تخم مرغ ۱۰۰، آرد سویا ۷۶/۲۹ و ایزوله پروتئین سویا ۶۸/۵۵ گزارش شده است [۳۴].

۴- نتیجه گیری

بررسی ترکیب شیمیایی آرد دانه کدو نشان داده است که آرد چربی‌گیری شده دانه کدو از مقادیر بالای پروتئین برخوردار است (حدود ۵۰٪ بر اساس وزن خشک). از آنجایی‌که امروزه یکی از اصول بهینه‌سازی مصرف، بکارگیری ضایعات کارخانجات صنایع غذایی می‌باشد، در این ارتباط می‌توان با بهره‌وری از پروتئین آرد دانه کدو که به‌عنوان ضایعات صنایع روغن‌کشی محسوب می‌گردد، استفاده بهینه در راستای ارتقای ارزش عملکردی و تغذیه‌ای مواد غذایی را دنبال کرد. با توجه به اینکه روش استخراج قلبایی و ترسیب اسیدی، روش متداول استخراج پروتئین می‌باشد، به‌منظور تعیین بهترین شرایط استخراج پروتئین از آرد روغن‌گیری شده دانه کدو، حلالیت پروتئین آرد دانه کدو در غلظت‌های مختلف نمک و pH‌های مختلف بررسی شد. نتایج حاصل نشان داد که میزان حلالیت با قدرت یونی محیط رابطه عکس داشته و در pH‌های بالای نقطه ایزوالکتریک (pH‌های قلبایی) افزایش می‌یابد. ایزوله کدو از ارزش تغذیه‌ای بالایی نیز برخوردار بود و منبع مناسبی از اسیدهای آمینه ضروری ترئونین، تیروزین، فنیل آلانین، لوسین، سیستئین و متیونین می‌باشد و در عین حال منبع ناکافی از نظر اسیدهای آمینه لایزین، والین و ایزولوسین می‌باشد. از آنجایی‌که پروتئین حبوبات و سویا از نظر اسید آمینه ضروری لایزین، غنی می‌باشند و نیز از نظر اسید

آمینه‌های گوگرددار نظیر اسیدآمینه سیستئین و متیونین فقیر می‌باشند، در نتیجه با مصرف همزمان ایزوله کدو و پروتئین‌های حبوبات و نیز ایزوله سویا می‌توان تا حد امکان کمبود اسیدهای آمینه محدودکننده هر یک از این پروتئین‌ها را جبران نمود. ارزش بیولوژیکی ایزوله پروتئین کدو معادل ۷۱/۲۱ می‌باشد که نشان دهنده کیفیت مناسب آن است.

از آنجایی‌که هر ساله بخش قابل توجهی از فرآورده‌های روغنی، از محصولات گیاهی از جمله کدو به‌دست می‌آید، طی این فرآوردی‌ها، مقدار زیادی تفاله تولید می‌گردد که دفع این تفاله‌ها از نظر اقتصادی و زیست محیطی هزینه‌بر و مشکل‌ساز است. بنابراین از طریق افزایش تولید ایزوله حاصل، می‌توان ضایعات حاصل از کارخانجات روغن‌کشی و مشکلات زیست محیطی را به حداقل رساند. به همین دلیل، پیشنهاد می‌شود که در زمینه تولید نیمه صنعتی ایزوله‌های پروتئینی کدو و کاربردهای صنعتی آن در ایران تحقیق و پژوهش شود.

۵- منابع

- [1] Nomikos, T Xanthopoulou, M.N., Nomikos, T., Fragopoulou, E., Antonopoulou, S. (2009). Antioxidant and Lipoxigenase Inhibitory Activities of Pumpkin Seed Extracts. *Food Research International*, 42: 641-646.
- [2] Esuoso, K., Lutz, H., Kutubuddin, M., Bayer, E. (1998). Chemical composition and potential of some underutilized tropical biomass. I: fluted pumpkin (*Telfairia occidentalis*). *Food Chemistry*, 61: 487-492.
- [3] Hong, L. H. (2005). Effect of pumpkin extracts on tumour growth inhibition in S180-bearing mice. *Journal of Preventive Medicine*, 12: 745-747.
- [4] Wenzl, T., Prettnner, E., Schweiger, K., Wagner F. S. (2002). An Improved Method to Discover Adulteration of Styrian Pumpkin Seed Oil. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 53: 193-202.
- [5] Seo, J.S., Burri, B.J., Quan, Z.J., Neidlinger, T.R. (2005). Extraction and chromatography of carotenoids from pumpkin. *Journal Chromatography A*, 1073: 371-375.
- [6] Xie, J.M. (2004). Induced polarization effect of pumpkin protein on B16 cell. *Journal of Fujian Medical University*, 38: 394-395.

- [18] Oser, B. L. (1995). protein and amino acid nutrition. Editor: New york. 281-291.
- [19] Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome 1968.
- [20] Crisan EW, Sands. (1978). A Nutritional value. In: Chang ST and Hayes WA (eds.). The biology and cultivation of edible mushrooms. Academic press, New York. 172-189.
- [21] Adebowale, K. O., Lawal, O. S. (2004). Comparative study of the functional properties of bambarra groundnut (*Voandzeia subterranean*), jack bean (*Canavaliaensiformis*) and mucuna bean (*Mucunapruriens*) flour. *Food Research International*, 37:355-365.
- [22] Zayas, J.F. (1997). Functionality of proteins in foods . *Berlin: Springer- Verlag*, 1-228.
- [23] Chau, C. F., Cheung, P. C. K. (1998). Functional properties of flours prepared from three Chinese indigenous legume seeds. *Food Chemistry*, 61: 429-433.
- [24] Lazos, E. (1992). Certain functional properties of defatted pumpkin seed flour. *Plant Foods for Human Nutrition*, 42: 257-273.
- [25] Abdel-Aal, E. M., Shehta, A. A., El-Mahdy, A. R., 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.
- [26] Faizi, S., Varidi, M., ZAREE, F., Varidi., M. J. (2014). Study of chemical composition, color parameters and functional properties of fenugreek flour and comparison with soybean flour. *Journal of Research and Innovation in Food Science and Technology*. 2: 30-38
- [27] Asadpour, E., Jafari, S. M., Sadeghi Mahunak, A., Ghorbani, M. (2012). Evaluation foaming capacity and emulsifying properties and the effect of pH and ionic strength on these characteristics in the flour of various cereals. *Iranian Journal of food science and technology*, 7: 20-29.
- [28] Singh, G., Wani, A.A., Kaur, D., Dalbir Singh Sogi, D. (2008). Characterization and functional properties of proteins of some Indian chickpea (*Cicer arietinum*) cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88:778-786.
- [29] Lawal, O. S., Adebowale, K. O., Ogunsanwo, B. M., Sosanwo, O. A., Bankole,
- [7] El-Soukkary, F. A. H. (2001). Evaluation of pumpkin seed products for bread fortification. *Plant Foods for Human Nutrition*, 56: 365-384.
- [8] Lazos, E. (1992). Certain functional properties of defatted pumpkin seed flour. *Plant Foods for Human Nutrition*, 42: 257-273.
- [9] Zivanovic, I., Vastag, Z., Popovic, S., Popovic, L., Pericin, D. (2010). Hydrolysis of hull-less pumpkin oil cake protein isolate by pepsin. *International Journal of Biological and Life Sciences*, 6 : 30-34.
- [10] Moure, A., Sineiro, J., Domínguez, H., Parajo, J. C. (2006). Functionality of oilseed protein products: a review. *Food Research International*, 39, 945-963.
- [11] Papalamprou, E.M., Doxastakis, G.I., Biliaderis C.G., and Kiosseoglou, V. (2009). Influence of preparation methods on physiochemical and gelation properties of chickpea protein isolates. *Food Hydrocolloid*, 23: 337-43.
- [12] Glew, R. H., Glew, R. S., Chuang, L. T., Huang, Y. S., Millson, M., Constans, D., Vanderjagt, D. J.(2006). Amino Acid, Mineral and Fatty Acid Content of Pumpkin Seeds (*Cucurbita* spp) and *Cyperus esculentus* Nuts in the Republic of Niger. *Plant Foods for Human Nutrition* 61: 51-56.
- [13] Kinsella, J. E. (1976). Functional properties of proteins in foods: A survey. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 7: 219-280.
- [14] AOAC. (2005). Official methods of analysis of the association of official analytical chemists, Vol. II. Arlington, VA: Association of Official Analytical Chemists.
- [15] Horax, R., Hettiarachchy, N., Over, K., Chen, P., Gbur, E. (2010). Extraction, fractionation and characterization of Bitter Melon seed proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 1892-1897.
- [16] Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- [17] Moore. S. (1963). On the determination of cystine and cysteic acid. *Journal of Biological Chemistry*, 238: 235-237

- hydrolysates. *Food Chemistry*, 104: 1641-1647.
- [33] El-Adawy, T. A., Taha, K. M. (2001). Characteristics and Composition of different seed oils and flours. *Food Chemistry*, 74: 47-54.
- [34] Basiri, L. (2012). Optimization of Coprecipitation conditions from Soy and Whey protein. (Thesis). University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan.
- [35] Zheng, H. G., Yang, X. Q., Ahmad, L., Min, M., Zhu, J. H. (2009). Soybean β -conglycinin constituent subunits: isolatin, solubility and amino acid composition. *Food Research International*, 42: 998-1003.
- S. A. (2004). On the functional properties of globulin and albumin protein fractions and flour of African locust bean (*Parkia biglobosa*). *food chemistry*, 92:681-691.
- [30] Shen, J.L. (1976). Solubility profile, intrinsic viscosity, and optical rotation studies of acid precipitated soy protein and of commercial soy isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24:784-788.
- [31] Bilgi, B., Celik, S. (2004). Solubility and emulsifying properties of barley protein concentrate. *European Food Research and Technology*, 218: 437-441.
- [32] Yalcin, E., Celik, S. (2007). Solubility properties of barley flour, protein isolates and

Characterization of Nutritional properties of protein Isolate of pumpkin (*Cucurbita pepo* Con. Pepo Var *Styriaca*) seeds

Mazloomi, S. N. ^{1*}, Sadeghi Mahoonak, A. R. ²

1. Ph. D. Student, Faculty of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
2. Associate Professor, Faculty of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

(Received: 2015/09/11 Accepted: 2016/03/14)

Every year large amount of oil seeds are produced from plant sources. However this process produces large amounts of oil cake with high amounts of protein and essential amino acids. On the other hand the disposal of this by-product is a big problem. So in the present research the protein from defatted pumpkin seed flour was extracted and the nutritional properties of its protein isolate were investigated. The protein solubility profile of defatted pumpkin seed determined as a function of pH between pH 1-12. Also the effect of NaCl concentration of 0.1, 0.5, and 1 M and pH 8, 9, 10, 11, 12 on protein solubility was determined. Pumpkin protein isolate was prepared from defatted pumpkin flour through the alkaline extraction and isoelectric precipitation. Chemical composition (protein, fat, ash, carbohydrate and water contents) of pumpkin protein isolates and defatted pumpkin seed flour were determined. In addition the nutritional characteristics of protein isolate were studied. The results showed that the solubility at acidic pH values decreased and the isoelectric point at least seems and then increased in basic pH values, and then solubility reached to maximum level at pH 10. The effect of salt concentration on protein solubility was significant at the 5% level ($P < 0.05$) and increased salt had the opposite effect on protein solubility. Nutritional value of pumpkin protein isolate was high and could be used as a good source of essential amino acids. Considering the high nutritional content of protein isolate of pumpkin, it can be used for improving nutritional content of different food product.

Keywords: Defatted seed flour, Protein isolate, Nutritional value.

* Corresponding Author E-Mail Address: samira.mazloomi@yahoo.com