مجله الکترونیک فرآوری و نگهداری مواد غذایی
جلد دوم، شماره چهارم، زمستان ۸۹
۷۱-۸۶
http://ejfpp.gau.ac.ir

بررسی ویژگی‌های حلالیت و الگوی الکتروفورز پروتئین‌های جوانه گندم

مهشید رهبری[۱]، مهران اعلمی[۲]، یحیی مقصودلو[۳] و مهدی کاشانی‌نژاد[۴]

[۱]دانشجوی کارشناسی‌ارشد علوم و صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع‌طبیعی گرگان، [۲]استادیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۳]دانشیار گروه علوم و صنایع‌غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۴]دانشیار گروه علوم و صنایع‌غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع‌طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۱/۲۲؛ تاریخ پذیرش:۹۱/۳/۳

چکیده

جوانه گندم یکی از مهم‌ترین بخش‌های دانه گندم بوده و دارای میزان بالایی پروتئین می‌باشد که حضور آن‌ها موجب ایجاد ویژگی‌های عملکردی مطلوب می‌گردد. حلالیت یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های عملکردی پروتئین‌ها می‌باشد، زیرا یک پروتئین، تنها به‌صورت محلول می‌تواند سایر ویژگی‌های عملکردی خود را نشان دهد. عوامل زیادی روی حلالیت پروتئین تاثیر دارند. مهم‌ترین آن‌ها pH و غلظت نمک می‌باشند. با توجه به این‌که معمول‌ترین روش استخراج پروتئین، روش استخراج قلیایی و ترسیب اسیدی می‌باشد، رسیدن به بیش‌ترین حلالیت، در افزایش بازده استخراج پروتئین عاملی مؤثر خواهد بود. در این پژوهش با هدف دست‌یابی به بهترین شرایط برای استخراج پروتئین، اثر غلظت نمک و pH محیط روی حلالیت پروتئین جوانه گندم مطالعه و الگوی حلالیت پروتئین در pH ۱۲-۱ تعیین گردید. حلالیت در غلظت‌های ۰، ۰/۱، ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ مولار، در pH ۹، ۹/۵، ۱۰ و ۱۰/۵ بررسی شد. نتیجه‌های نشان داد که بین حلالیت در pH و غلظت‌های نمک، در سطح ۵ درصد، تفاوت معنی‌دار وجود دارد. حلالیت در pH اسیدی کم‌تر بوده و در نقطه ایزوالکتریک به حداقل می‌رسد. سپس در pHهای قلیایی افزایش یافته و در pH ۱۰حداکثر می‌شود. به‌طورکلی حلالیت با افزایش غلظت نمک کاهش یافت و در غلظت۱ مولار کم‌ترین میزان را نشان داد. حداکثر حلالیت در غلظت ۰/۵ مولار و pH ۱۰ مشاهده شد. همچنین جهت دست‌یابی به ساختار

*مسئول مکاتبه: rahbari.mahshid@yahoo.com

مولکولی و نوع باندهای پپتیدی در هر جزء و مقایسه ساختار ایزوله پروتئین به‌دست آمده از روش استخراج قلیایی و آرد جوانه گندم، الگوی الکتروفورزی آن‌ها بررسی گردید.

واژه‌های کلیدی: پروتئین جوانه گندم، حلالیت، pH، غلظت نمک، الکتروفورز

مقدمه

جوانه گندم یکی از مهم‌ترین فراورده‌های جانبی حاصل از آسیاب گندم است. این فراورده منبع غنی از ویتامین‌ها، پروتئین‌ها، فیبر رژیمی و مواد معدنی می‌باشد. علاوه‌بر این مقادیری از فلاونوئیدها، استرول‌ها و گلوتاتیون در آن وجود دارد. بنابراین جوانه گندم به‌عنوان یک غذای سالم، می‌تواند به پیش‌گیری از بیماری‌های مختلف و برخی از انواع سرطان‌ها کمک کند [٦]. جوانه گندم حاوی حدود ۱۰ درصد روغن بوده که به‌طور عمده در صنایع غذایی، دارویی و آرایشی، بهداشتی استفاده می‌شود. فراورده جانبی مهم فرایند استخراج روغن، جوانه چربی گرفته شده (DWG)[1] نام دارد که مقدار به‌نسبت بالایی (حدود ۳۵ درصد) پروتئین دارد. پروتئین‌های عمده جوانه گندم آلبومین و گلوبولین می‌باشند[۲۸].

نظر به رشد سریع جمعیت جهان، تقاضا برای مصرف غذاهای پروتئینی افزایش یافته است. اما پروتئین‌های حیوانی هزینه بالایی داشته و در همه کشورها در دسترس نمی‌باشند. بنابراین در سال‌های اخیر، توجه بیش‌تری به پروتئین‌های گیاهی به‌عنوان جایگزین‌های جدید و منابع ارزان قیمت پروتئین با کیفیت بالا شده است. اغلب پروتئین‌های گیاهی به‌دلیل فقدان اسیدهای آمینه ضروری، کامل نیستند، اما پروتئین جوانه گندم دارای اسیدهای آمینه ضروری بوده و از این رو هم ردیف پروتئین‌های حیوانی با ارزش مانند گوشت یا تخم‌مرغ طبقه‌بندی می‌شود [۱۲].

پروتئین‌ها به‌صورت ایزوله یا کنستانتره، دارای ویژگی‌های عملکردی مهمی مانند حلالیت، امولسیون کنندگی، کف کنندگی می‌باشند [۹]. هتیاراکچی و همکاران، جی و همکاران، حسن و همکاران [۱۰، ۱۲، ۱۳]. ویژگی‌های عملکردی ایزوله‌های پروتئینی تهیه شده از جوانه گندم چربی گرفته شده را مطالعه نموده‌اند. در میان ویژگی‌های عملکردی پروتئین‌ها، حلالیت یکی از مهم‌ترین و اساسی‌ترین آن‌ها می‌باشد، زیرا یک پروتئین باید به‌صورت محلول باشد تا بتواند سایر ویژگی‌های

1- Defatted Wheat Germ

عملکردی خود را نشان دهد. حلالیت پروتئین یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های عملکردی پروتئین بوده که بر روی کاربرد آن در فرمولاسیون مواد غذایی تاثیر دارد. همچنین حلالیت پروتئین، به‌طورمعمول اولین ویژگی عملکردی می‌باشد که در طی آزمون‌های ترکیبات پروتئینی اندازه‌گیری می‌شود [۲٤] . کینسلا [۱٤] فاکتورهای مؤثر روی ویژگی‌های حلالیت پروتئین‌ها را بیان کرده است. از جمله مهم‌ترین ویژگی‌ها، pH و قدرت یونی محیط می‌باشند. در حال حاضر، اطلاعات کافی در مورد ویژگی‌های حلالیت پروتئین جوانه گندم و تغییرات الگوی حلالیت تحت تاثیر فاکتورهای مختلف وجود ندارد. این مطالعه به بررسی الگوی حلالیت پروتئین جوانه گندم در pHهای ۱۲-۱ و اثر pH و غلظت‌های مختلف نمک بر روی حلالیت، با هدف تعیین بهترین شرایط برای استخراج پروتئین از جوانه گندم و تهیه ایزوله پروتئینی پرداخته است. همچنین به‌منظور مطالعه ساختار پروتئین‌ها، جزءهای پروتئینی با روش جزء به جزء کردن مجزا شده، میزان، نحوه توزیع و الگوی الکتروفورزی آن‌ها در جوانه گندم بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

مواد اولیه این پژوهش شامل جوانه گندم خالص از یکی از کارخانه‌های آرد گرگان تهیه گردید. مرحله‌های انجام این پژوهش به شرح زیر است:

مرحله اول: تهیه آرد جوانه گندم: نمونه‌های جوانه گندم خالص فاقد سبوس از کارخانه آرد تهیه شدند. به‌منظور حذف آلودگی‌ها، ابتدا جوانه گندم تمیز شد، سپس در اثر تماس با هگزان به‌مدت ۸ ساعت و طی هم‌زدن مداوم، چربی‌گیری و در دمای اتاق خشک شد. جوانه گندم چربی‌گیری شده توسط آسیاب آزمایشگاهی (Perten,3100ساخت کشور آلمان)، آسیاب شد، به‌طوری‌که ذرات آرد شده از الک با مش ۱۰۰ عبور کنند.

مرحله دوم: آنالیز شیمیایی جوانه گندم خالص[1] و آرد جوانه گندم‌چربی گرفته شده مورد بررسی مانند رطوبت، پروتئین، چربی، خاکستر و کربوهیدارت انجام شد [۳].

مرحله سوم: تعیین الگوی حلالیت پروتئین جوانه گندم: حلالیت پروتئین آرد جوانه گندم چربی گرفته شده مطابق روش کینسلا [۱٤] با کمی تغییرات، تعیین شد. به‌منظور تعیین الگوی حلالیت،

1- Row Wheat Germ (RWG)

سوسپانسیون‌هایی از آرد جوانه چربی گرفته شده در آب مقطر به نسبت (۱:۱۰v/v) تهیه شد. سوسپانسیون‌های حاصل در دمای اتاق به‌مدت یک ساعت روی هم‌زن مغناطیسی مخلوط، سپس pH سوسپانسیون‌ها توسط NaOH و HCl ۰/۵ مولار روی ۱۲-۱ تنظیم شده و به‌مدت ۳۰ دقیقه تحت هم‌زدن مداوم، ثابت نگه داشته شد. سپس سوسپانسیون‌های حاصل در دور ۸۰۰۰rpm، به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد توسط سانتریفوژ یخچال‌دار (Hanil, combi 514R) سانتریفوژ شده و سوپرناتانت‌های حاصل با عبور از کاغذ واتمن شماره ۲ جدا شدند. مقدار پروتئین خام در سوپرناتانت مطابق روش میکروکجلدال به‌دست آمد. حلالیت به‌عنوان درصدی از پروتئین کل بیان شد (فاکتور پروتئینی ۵/۷ در نظر گرفته شد).

(۱۰۰× کل پروتئین آرد جوانه گندم چربی گرفته شده/ پروتئین موجود در سوپرناتانت)= درصد حلالیت

همچنین با توجه به روش‌های استخراج پروتئین ذکر شده در مطالعات مختلف [۱۰، ۱۲، ۱۳]، به‌منظور برسی اثر متقابل غلظت نمک و pH بر روی حلالیت، سوسپانسیونی از آرد جوانه چربی گرفته شده در غلظت‌های مختلف NaCl (۰، ۰/۱، ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ مولار) تهیه و برای هر غلظت نمک، pHهای ۹، ۹/۵، ۱۰ و ۱۰/۵ که مطابق آزمون‌های انجام شده در محدوده حداکثر حلالیت می‌باشند، تنظیم شده و مراحل قبل تکرار شد.

تمامی آزمایش‌ها در ۳ تکرار انجام شد و مقادیر میانگین و انحراف استانداردهای متناظر گزارش شدند.

مرحله چهارم: جزء به جزء کردن پروتئین‌های جوانه گندم و تهیه ایزوله پروتئینی: جزء به جزء کردن پروتئین‌ها بر طبق روش کلاسیک Osborne [۱۲] با اندکی تغییرات مطابق با روش ژو و همکاران [۲۸] به‌این صورت انجام شد: سوسپانسیون آرد و آب (۱:۱۰w/v) به‌مدت ۲ ساعت در دمای اتاق مخلوط شد و سپس در دورrpm ۸۰۰۰ به‌مدت ۲۰ دقیقه و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد، توسط سانتریفوژ یخچال دار سانتریفوژ گردید. سوپرناتانت حاصل ذخیره و رسوب مانند مرحله قبل مجددا با آب مخلوط و سانتریفوژ شد. سوپرناتانت‌های حاصل ترکیب شده، توسط خشک کن انجمادی (Operunمدل FDB 5503- کره جنوبی) خشک شدند و به‌عنوان جزء آلبومین (محلول در آب) نگه‌داری شدند. رسوب حاصل در مرحله قبل در محلول ۵۰ میلی‌مولار Tris-HCl با pH ۸ حاوی NaCl نیم‌مولار مطابق شرایط قبل طی دو مرحله، مخلوط و سانتریفوژ شد. سوپرناتانت‌های حاصل

ترکیب شده و در مقابل آب دیونیزه به‌مدت ۷۲ ساعت توسط کیسه دیالیز، دیالیز شدند. سوپرناتانت-های دیالیز شده توسط خشک کن انجمادی خشک و پودر پروتئینی حاصل به‌عنوان گلوبولین (محلول در آب نمک) ذخیره شد. رسوب حاصل دوباره در محلول (v/v ۷۰ درصد) ۲- پروپانول حل شده و طی هم‌زدن مداوم به‌مدت ۲ ساعت، دو مرتبه استخراج و مانند شرایط قبل سانتریفوژ شد. سوپرناتانت‌های حاصل توسط خشک کن انجمادی خشک و به‌عنوان جزء پرولامین (محلول در الکل)، ذخیره شدند. رسوب حاصل دوباره در محلول ۰/۰۵۰ مولار NaOH حل شده و سانتریفوژ گردید. سوپرناتانت‌ها در مقابل آب دیونیزه به‌مدت ۷۲ ساعت دیالیز شده و سوپرناتانت‌های دیالیز شده توسط خشک کن انجمادی خشک شدند. پودرهای پروتئینی حاصل، به‌عنوان گلوتلین ذخیره شدند. به‌منظور اندازه‌گیری پروتئین از روش میکروکجلدال استفاده شد (فاکتور پروتئینی ۵/۷ در نظر گرفته شد).

تهیه ایزوله پروتئینی: مطابق مطالعات انجام شده [۱۰، ۱۲، ۱۳] و نتیجه‌های به‌دست آمده از مراحل قبل، از روش استخراج قلیایی و ترسیب اسیدی برای تهیه ایزوله پروتئینی استفاده گردید. ابتدا سوسپانسیونی از DWGF و محلول ۰/۵ مولار NaCl تهیه و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق مخلوط شد، سپس pH سوسپانسیون با استفاده از NaOH ۰/۵ مولار روی ۱۰ تنظیم و به‌مدت ۳۰ دقیقه ثابت نگه داشته شد. سوسپانسیون حاصل در rpm ۸۰۰۰ به‌مدت ۲۰دقیقه و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد، با استفاده از سانتریفوژ یخچال‌دار، سانتریفوژ گردید. سوپرناتانت حاصل با استفاده از کاغذ واتمن شماره ۲ جدا شده و به‌منظور ترسیب پروتئین‌ها، با استفاده از HCl ۰/۵ مولار، pH آن روی ٤ تنظیم شد. پس از ۳۰ دقیقه، دوباره سانتریفوژ انجام شده و رسوب‌های حاصل جدا شده و به‌عنوان ایزوله پروتئینی، با استفاده از خشک کن انجمادی، خشک شدند.

مرحله پنجم: ژل الکتروفورز SDS-PAGE

الکتروفورز پروتئین جوانه گندم با ژل SDS-PAGE بر طبق روش لاملی [١٦] با اندکی تغییرات انجام شد.

در این روش از ژل متراکم‌کننده ۵ درصد و ژل جداکننده 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 اسید استیک و ۷/۵ درصد متانول) انجام شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از طرح کاملاً تصادفی در قالب آزمایش فاکتوریل دو عاملی با سه تکرار انجام شد. فاکتور اول، pH در سطوح ۹، ۹/۵، ۱۰ و ۱۰/۵ و فاکتور دوم، غلظت نمک در سطوح صفر، ۰/۱، ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ مولار بود.

نتایج و بحث

ترکیب شیمیایی جوانه گندم خالص و آرد جوانه گندم چربی گرفته شده: محتوای رطوبت، خاکستر، چربی، پروتئین و کربوهیدارت RWG وDWGF در جدول ۱ آورده شده است. نتیجه‌های نشان می‌دهند که DWGF حاوی مقدار نسبتاً بالایی (۳۱/٤۲wb درصد) پروتئین در مقایسه با RWG (۲۷/۷۱ wb درصد) می‌باشد. عمل چربی‌گیری موجب کاهش قابل ملاحظه در چربی جوانه گندم شد (۱۰/٤۹ درصد به ۰/۷۵ درصد). RWG و DWGF حاوی میزان بالایی کربوهیدرات نیز بودند (به‌ترتیب ٤۷/٤۲ درصد و ۵۲/۱۳ درصد).

جدول ۱- ترکیب شیمیایی RWG و DWGF (g/۱۰۰ g wb).

	رطوبت	خاکستر	چربی	پروتئین (N ×۵/۷)	کربوهیدرات
RWG	۱۱/۰۲± ۰/۰۹a	٤/۵± ۰/۰۰۵a	۱۰/٤۹± ۰/۲a	۲۷/۷۱± ۰/۱۳b	٤۷/٤۲
DWGF	۹/۸۸± ۰/٤۵b	٤/٦۸± ۰/۲۲a	۰/۷۵± ۰/٤b	۳۱/٤۲± ۰/۲٦a	۵۲/۱۳

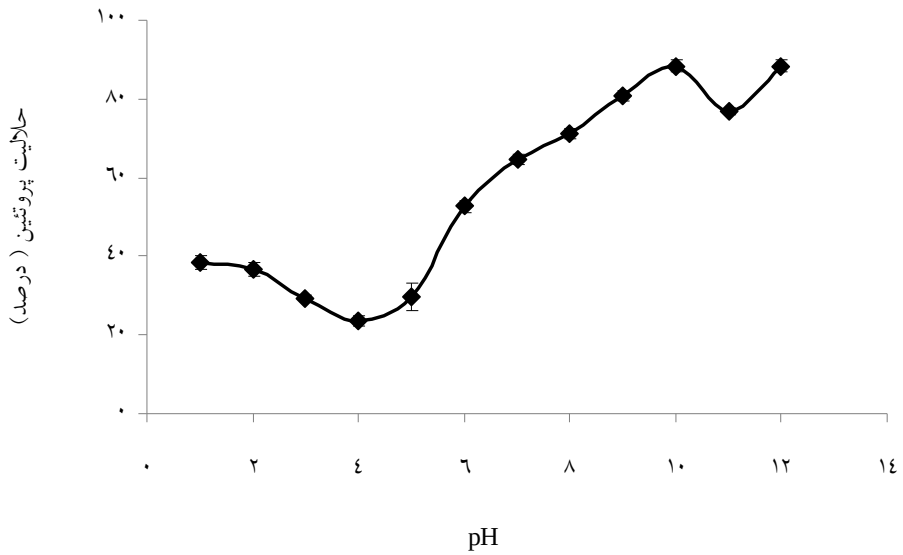
a. حروف مشترک در سطح اطمینان ۵ درصد معنی‌دار نمی‌باشند.

حلالیت پروتئین: الگوی حلالیت پروتئین در pHهای مختلف به‌عنوان شاخص در کاربرد آرد و پروتئین در سیستم‌های غذایی به‌کار می‌رود. زایاس [۲٦] محدوده pH=٤/۵ را برای بیش‌تر گیاهان، محدوده نقطه ایزوالکتریک دانستند. در این نقطه هیچ‌گونه بار الکتریکی روی مولکول وجود ندارد و هیچ نوع دافعه‌ای به‌وجود نمی‌آید [۱۵].

الگوی حلالیت پروتئین در شکل ۱ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، بیش‌ترین میزان حلالیت در pH ۱۰ و کم‌ترین میزان حلالیت در pH ٤ (نقطه ایزو الکتریک) می‌باشد (به ترتیب ۸۸/۳۷ و ۲۳/٤۷ درصد). حلالیت در مقادیر pH اسیدی کاهش می‌یابد تا به نقطه ایزو الکتریک برسد

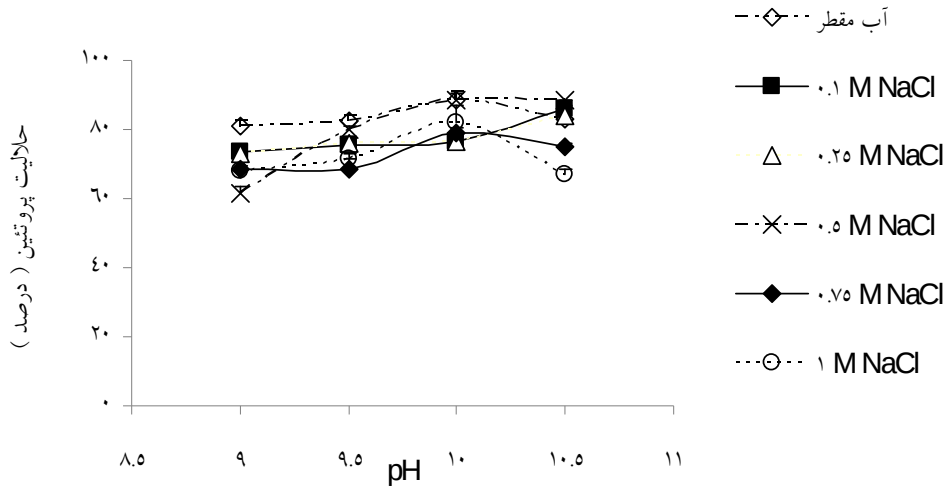
(pH ٤)، سپس در pH قلیایی افزایش یافته و در pH ١٠ به حداکثر می‌رسد، پس از آن کمی کاهش نشان می‌دهد، سپس دوباره افزایش می‌یابد. نتیجه‌های آنالیز آماری نشان داد که بین حلالیت در pHهای مختلف، در سطح ٥ درصد اختلاف معنی‌دار وجود دارد (P<٠/٠٥). به‌طورکلی بیش‌ترین حلالیت در محدوده pH قلیایی و کم‌ترین حلالیت در محدوده pH اسیدی (اطراف نقطه ایزو الکتریک) مشاهده شد. علت این پدیده آن است که پروتئین‌ها زمانی به‌صورت محلول می‌باشند که دافعه الکترو استاتیکی بین پروتئین‌ها بیش از واکنش‌های آبگریزی باشد. در نقطه ایزو الکتریک، 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 به‌علت دافعه الکترو استاتیک بین پروتئین‌ها، حلالیت افزایش می‌یابد [١، ٧، ١٨ و ٢٠] .

حلالیت پروتئین در مقادیر pH اسیدی به سمت pH ٤ کاهش می‌یابد و سپس در محدوده pH قلیایی افزایش می‌یابد. از محدوده pH ٦ به سمت pHهای بالاتر، میزان افزایش حلالیت بیش‌تر می‌باشد. این رفتار مشابه با بسیاری از گزارش‌ها پیرامون حلالیت پروتئین گیاهان مختلف می‌باشد [١، ٧ و ١٨]. همچنین سایر مطالعات روی جوانه گندم نیز pH ٤ را به‌عنوان نقطه ایزو الکتریک پروتئین معرفی کرده‌اند [١٠، ١٢، ١٣ و ٢٨].



شکل ١- الگوی حلالیت پروتئین آرد جوانه گندم چربی گرفته شده.

اثر متقابل pH و غلظت نمک بر روی الگوی حلالیت پروتئینDWGF در شکل ۲ مشاهده می‌شود. نتیجه‌های به‌دست آمده از آنالیز آماری نشان داد که بین مقادیر حلالیت در pH و غلظت‌های مختلف نمک در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار وجود دارد (P<۰/۰۵).

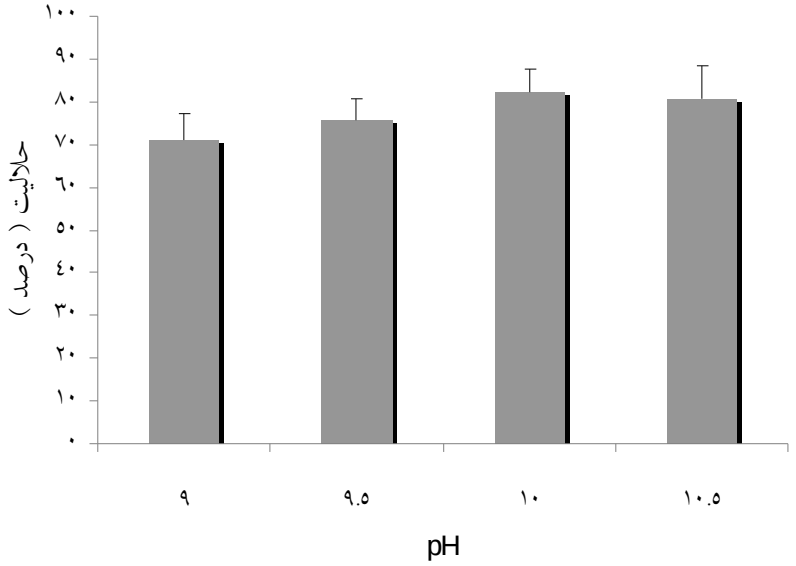


شکل ۲- اثر pH و غلظت نمک بر حلالیت پروتئین آرد جوانه گندم چربی گرفته شده.

همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود، حضور نمک حلالیت پروتئین را کاهش داد. حلالیت پروتئین در غلظت ۰/۷۵ مولار NaCl به‌طورتقریبی مشابه با محلول ۱ مولار NaCl بود و اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (به‌ترتیب ۷۲/۷۲ و ۷۲/۲۵ درصد). همچنین از نظر آماری تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد، در مقادیر حلالیت پروتئین در محلول‌های ۰/۱، ۰/۲۵ و ۰/۵ مولار وجود نداشت (به‌ترتیب ۷۸/۰۳، ۷۷/۹۲، ۷۹/٦۳ درصد)، اما حلالیت در غلظت‌های مختلف NaCl در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار نشان داد (P<۰/۰۵). به‌طورکلی در غلظت نمک ۰/۵ مولار و pH ۱۰ حداکثر حلالیت مشاهده شد (۸۸/٥٦ درصد).

نتیجه‌های به‌دست‌آمده از اثر pH بر حلالیت پروتئین نشان داد که حلالیت در pH ۱۰ و ۱۰/۵ بالاتر از سایر pHها بود و این دو pH در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند، اما با

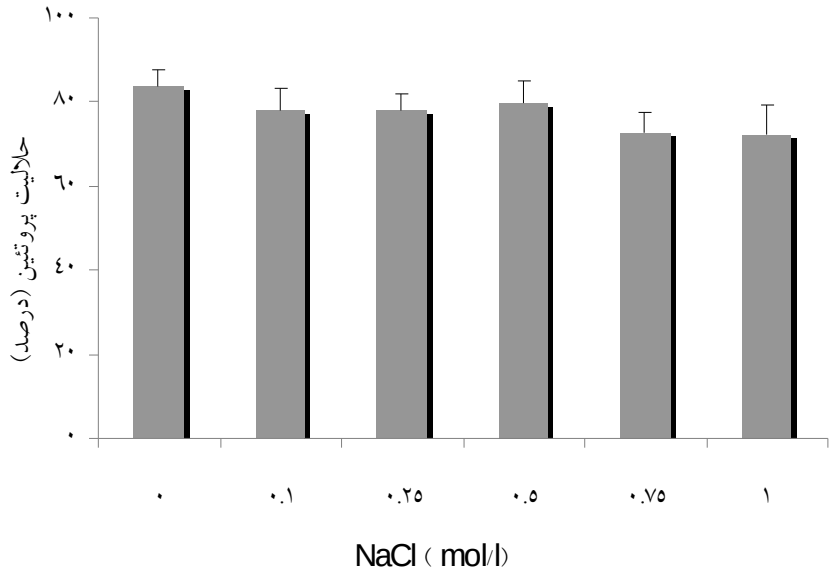
pHهای ۹ و ۹/۵ تفاوت معنی‌دار نشان دادند (P<۰/۰۵)، به‌ترتیب ۸۲/۳۷ و ۸۰/٦۰ درصد در مقابل ۷۰/۹۰ و ۷۵/٦۰ درصد. شکل ۳ اثر pH را بر حلالیت پروتئین نشان می‌دهد.



شکل ۳- اثر pH بر حلالیت پروتئین (حروف متفاوت نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد)

نتیجه‌های این مطالعه نشان می‌دهند که حلالیت پروتئین DWGF با قدرت یونی محلول رابطه عکس دارد، اگرچه میزان حلالیت پروتئین در محلول‌های ۰/۱ تا ۰/۵ مولار NaCl به‌طورتقریبی مشابه یکدیگر می‌باشند (شکل ٤). در این محدوده غلظت NaCl، جزءهای پروتئینی غالب، آلبومین و گلوبولین، به‌صورت محلول می‌باشند. با افزایش غلظت نمک، پروتئین کم‌تر محلول شده و حلالیت کاهش می‌یابد. بنابراین حلالیت به‌طور قابل ملاحظه در محلول‌های ۰/۷۵ و ۱ مولار کاهش می‌یابد (P<۰/۰۵).

به‌طور کلی بیش‌ترین میزان حلالیت در غلظت ۰/۵ مولار و در pH ۱۰ مشاهده شد که از مقادیر حلالیت در آب مقطر (غلظت صفر) نیز بالاتر بود (به‌ترتیب ۸۸/٥٦ در مقابل ۸۸/۳۷ درصد). در pHهای ۹ و ۹/۵، میزان حلالیت پروتئین در آب مقطر نسبت به سایر غلظت‌ها بالاتر بود. پروتئین در غلظت ۱ مولار کم‌ترین حلالیت را نشان داد. در میان pHهایی که در محدوده حلالیت می‌باشند، کاهش حلالیت در pHهای کم‌تر، بیشتر مشاهده شد.



شکل ٤- اثر غلظت NaCl بر حلالیت پروتئین (حروف متفاوت نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد)

علت این پدیده می‌تواند بر اساس واکنش‌های پروتئین- پروتئین و پروتئین- حلال توضیح داده شود. مطالعات نشان می‌دهند که در pH های اسیدی، گروه‌های کربوکسیل پروتونه بوده و پروتئین یک بار مثبت خالص دارد. با افزودن NaCl، یون‌های Cl با بار منفی با پروتئین‌های باردار مثبت واکنش می‌کنند و موجب کاهش در دافعه الکترواستاتیک و افزایش در واکنش‌های آبگریزی می‌گردند. نتیجه آن گرایش بیش‌تر پروتئین به تشکیل توده نامحلول و کاهش حلالیت می‌باشد [۲، ٤، ۵، ۱۵].

طبق نتیجه‌های به‌دست آمده، می‌توان اظهار داشت که حلالیت پروتئین جوانه گندم به میزان زیادی تحت تاثیر تغییرات pH و قدرت یونی محیط می‌باشد. به‌طوری که با قدرت یونی محیط، رابطه عکس داشته و در pHهای قلیایی بیش‌ترین میزان را دارد. نتیجه‌های مشابه در مورد سایر پروتئین‌های گیاهی توسط محققان مختلف گزارش شده‌اند [۱۸، ۱۹، ۲۲، ۲۵].

با توجه به‌نتیجه‌های به‌دست آمده از اثر مقادیر مختلف pH و غلظت نمک بر روی حلالیت پروتئین و با در نظر گرفتن روش استخراج پروتئین، می‌توان غلظت ۰/۵ مولار NaCl و pH ۱۰ را بهترین شرایط برای استخراج پروتئین از جوانه گندم به‌منظور تهیه ایزوله پروتئینی، تعیین نمود.

جزء به جزء کردن پروتئین‌های جوانه گندم: جدول ۲ نحوه توزیع و محتوای پروتئین هر یک از جزءهای پروتئین را نشان می‌دهد. بیشترین محتوای پروتئین در جزء گلوبولین مشاهده شد، پس از آن به‌ترتیب گلوتلین، آلبومین و پرولامین بیشترین میزان پروتئین را نشان دادند. استخراج مقدار زیادی کربوهیدرات و رنگدانه به‌همراه جدا کردن آلبومین و پرولامین، احتمالا موجب کاهش محتوای پروتئین آن‌ها شده است. آلبومین (محلول در آب) جزء پروتئینی غالب بوده و بیش‌ترین مقدار از پروتئین کل را به خود اختصاص داد (۳۳/۷ درصد). نحوه توزیع سایر جزءهای پروتئینی به‌ترتیب مربوط به گلوبولین، پرولامین و گلوتلین بود (به‌ترتیب ۱٦/۵، ۱۱/۳ و ۳/۸ درصد). ۳٤/۷ درصد از پروتئین کل نیز مربوط به قسمت نامحلول بوده که به‌صورت جزء نامحلول در طی جزء به جزء کردن پروتئین‌ها جدا شد. این میزان نشان می‌دهد که روش جزء به جزء کردن پروتئین‌ها با چهار حلال نمی‌تواند همه پروتئین‌ها را استخراج کند. نتیجه‌های به‌دست‌آمده از مقدار پروتئین و نسبت آن‌ها در دانه، با نتیجه‌های مطالعه گریو و لکلرک [۱۱] مطابقت داشت، اما از نظر نسبت جزءهای پروتئینی، با نتیجه‌های ژو و همکاران [۲۸] که پس از آلبومین و گلوبولین، به‌ترتیب گلوتلین و پرولامین را به‌عنوان جزء غالب تعیین کرده‌اند، مغایر بود. علت این تفاوت احتمالا به‌دلیل تفاوت در واریته گندم و شرایط استخراج می‌باشد.

جدول ۲- نحوه توزیع جزءهای پروتئین آرد جوانه گندم[a].

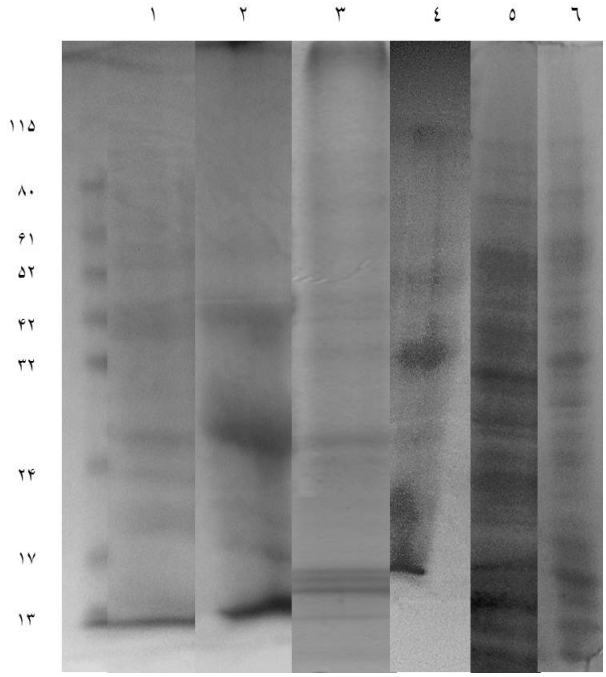
	نسبت (درصد از پروتئین کل)[b]
آلبومین	۳۳/۷±۰/۰۱۷[a]
گلوبولین	۱٦/۵±۰/۰۲۵[b]
پرولامین	۱۱/۳±۰/۰۲[c]
گلوتلین	۳/۸±۰/۰۲[d]
[c]باقی مانده نامحلول	۳٤/۷

[a]حروف مشترک در سطح اطمینان ۵ درصد معنی‌دار نمی‌باشند، [b]نسبت جزء پروتئین= پروتئین کل در ۱۰۰ گرم آرد جوانه گندم/ پروتئین کل هر جزء استخراج شده از ۱۰۰ گرم آرد جوانه گندم، [c]باقی‌مانده نامحلول= (گلوتنین+ پرولامین+ گلوبولین+ آلبومین)-۱۰۰.

الگوی الکتروفورزی جزءهای پروتئین: الگوی SDS-PAGE جزءهای پروتئین جوانه گندم در شکل ٥ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، توزیع زیر واحدهای پروتئین برای آلبومین پیچیده و وسیع می‌باشد. حدود ۱۷ باند پلی‌پپتیدی بر اساس وزن مولکولی جدا شدند: ١٤، ١٥، ١٧، ١٨، ٢٠، ٢٢، ٢٤، ٢٨، ٣٤، ٣٥، ٤٢، ٤٦، ٥٥، ٥٧، ٦٠، ٧١، ٧٨. گلوبولین در مقایسه با آلبومین، دارای باندهای پلی‌پپتیدی کم‌تری بود. ٤ باند پلی‌پپتیدی به‌صورت منفرد و گروهی مشاهده شدند، شامل: ٤٢-٣٢، ٣٢-٢٤، ٢٤-١٧ و ٥٥. مطالعات مختلف نشان می‌دهند که گلوبولین دانه گندم حاوی تنها دو جزء با ثابت ترسیب α و γ می‌باشد، به‌علاوه، جوانه گندم غنی از گلوبولین ٨S می‌باشد [٨]. جزء S ٨ گلوبولین در گندم شامل پلی پپتیدهای ٤٠ و ٥٥-٥٠ می‌باشد. بنابراین در باند ٤٢-٣٢ و ٥٥ ممکن است جزء ٨S گلوبولین در جوانه وجود داشته باشد. ژو و همکاران نیز به نتیجه‌های مشابه در مورد توزیع جزءهای پروتئین در جوانه گندم دست یافتند [٢٨]. علاوه‌بر این، گلوبولینی به‌نام تریتیسین نیز در اندوسپرم نشاسته‌ای گندم وجود دارد. ترتیسین شامل زنجیرهای پلی پپتیدی بزرگ (٤٠) و کوچک (٢٣-٢٢) می‌باشد. [٢٣] این زیر واحدها در الگوی حاضر در باندهای ٢٤ و ٤٢-٣٢ وجود دارد، اگرچه با نتیجه‌های به‌دست آمده از الگوی الکتروفورزی دو گلوبولین خالص شده از دانه گندم که شامل دو زیر واحد ٣٥ و ٤٩ بودند، مطابقت ندارد [١٦] ولی با نتیجه‌های ژو و همکاران [٢٨] مطابق است.

پرولامین دارای یک باند غالب در ١٨-١٦ و برخی باندهای کوچک و پراکنده در ٢٨، ٣٢، ٣٤، ٣٥، ٤٨ و ٥٢ می‌باشد. گلوتلین، جزء پروتئینی با وزن مولکولی بالا، ٥ باند پلی پپتیدی اصلی نشان داد که شامل پلی پپتیدها با وزن مولکولی بالا نبودند. دلیل این امر احتمالا وارد نشدن برخی از ترکیبات پروتئینی با وزن مولکولی بالا در ژل می‌باشد. باندهای مشاهده شده شامل ١٤، ١٥، ٢٨ و ٤٢ بودند.

الگوی SDS-PAGE ایزوله پروتئین به‌طورتقریبی مشابه الگوی الکتروفورزی DWGF بود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که در روش استخراج قلیایی و ترسیب اسیدی، اکثر جزءهای پروتئینی در جوانه گندم قابل استخراج می‌باشند. جی و همکاران [١٠] نیز در مورد الگوی الکتروفورز ایزوله پروتئینی جوانه گندم، به نتیجه‌های مشابهی دست یافته‌اند.



شکل ٥- الگوی الکتروفورز پروتئین جوانه گندم (۱- آلبومین، ۲- گلوبولین، ۳- پرولامین، ٤- گلوتنین، ٥- آرد جوانه گندم چربی گرفته شده، ٦- ایزوله پروتئین جوانه گندم.

منابع

1.Adebowale, K.O., & Lawal, O.S. (2004). Comparative study of the functional properties of bambarra groundnut flours. *Food Research International*, 37, 355-365.

2.Aluko, R.E., & Yada, R.Y. (1995). Structure–function relationships of cowpea (*Vigna unguiculata*) globulin isolate: Influence of pH and NaCl on physicochemical and functional properties. *Food Chemistry*, 53, 259–265.

3.AOAC. (2005). Official methods of analysis of the association of official analytical chemists, Vol. II. Arlington, VA: *Association of Official Analytical Chemists.*

4.Bera, M.B., & Mukherjee, R.K. (1989). Solubility, emulsifying and foaming properties of rice bran protein concentrates. *Journal of Food Science*, 54: 1. 142–145.

5.Bilgi, B., & C., Elik, S. (2004). Solubility and emulsifying properties of barley protein concentrate. *European Food Research & Technology*, 218, 437–441.

6.Boros, L., Nichellati, M., & Shoenfeld, Y. (2005). Fermented Wheat Germ Extract (Avemar) in the Treatment of Cancer & Autoimmune Diseases. *NewYork Academy of Sciences*, 529-542.

7.Chau, C.F., & Cheung, P.C.K. (1998). Functional properties of flours prepared from three Chinese indigenous legume seeds. *Food Chemistry*, 61: 4. 429–433.
8.Danielson, C.E. (1956). Plant proteins. Ann. Rev. *Plant Physiology*, 7, 215-236.
9.Fatma, L., Ahmed, A., Rezq, M., & Rhman, M. (2010). Additional effect of defatted wheat germ protein isolate on nutritional value and functional properties of yogurts and biscuits. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 4: 8. 3139-3147.
10.Ge, Y., Sun, A., Ni, Y., & Cai, T. (2001). Study and development of defatted wheat germ nutritive noodle. *European Food Research Technology*, 212, 344-348.
11.Grewe, E., & LeClerc, J.A. (1943). Commercial wheat germ, its com-position. *Cereal Chemistry*. 20, 423-434.
12.Hassan, H.M.M., Afify, A.S., Basyiony, A.E., Ahmed, A.E., Ghada, T. (2010). Nutritional and functional properties of defatted wheat protein isolates. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 4: 2. 348-358.
13.Hettiarachchy, N.S., Griffin, V.K., & Gnanasambandam, R. (1996). Preparation and functional properties of a protein isolate from defatted wheat germ. *Cereal Chemistry*, 73, 364-367.
14.Kinsella, J.E. (1976). Functional properties of proteins in foods: A survey. CRC *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 7, 219-280.
15.Kolar, C.W., Richert, S.H., Decker, C.D., Steinke, F.H., Vander Zanden, R.J. (1985). Isolated soy protein. In A.M., Altschul and H.L. Wilcke (Eds.). (Pp. 259–299). New protein foods.
16.Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
17.Marcone, M.F., Kakuda, Y., & Yada, R.Y. (1998). Salt-soluble seed globulins of various dicotyledonous and monocotyledonous plants. II. Structural characterization. *Food Chemistry*. 63, 265-274.
18.McWatters, K.H., & Holmes, M.R. (1979). Influence of pH and salt concentration on nitrogen solubility and emulsification properties of soy flour. *Journal of Food Science*, 44, 770–773.
19.Mwasaru, M.A., Muhammad, K., Bakar, J., & Che Man, Y.B. (2000). Influence of altered solvent environmenton the functionality of isolates. *Journal of Food Chemistry*, 71, 157–165.
20.Narayana, K., & Narasinga Rao, M.S. (1982). Functional properties of raw and heat processed winged bean (Psophocarpus tetragonolobus) flour. *Journal of Food Science*, 47, 1534- 1538.
21.Osborne, T.B. (1924). The vegetable proteins. 2nd Ed. Longmans Green and Co: London.
21.Prinyawiwatkul, W., Beuchat, L.R., & McWatters, K.H. (1993). Functional property changes in partially defatted peanut flour caused by fungal fermentation and heat treatment. *Journal of Food Science*, 58, 1318–1323.

22.Singh, N.K., Sherpherd, K.W., Langridge, P., Gruen, L.C., Skerritt, J.H., & Wrigley, C.W. (1988). Identificationa of legumin- like proteins in wheat. Plant Mol Biol, 11, 633-639.
23.Yalcin, E., & Celik, S. (2007). Solubility properties of barley flour, protein isolates and hydrolysates. *Food Chemistry*, 104, 1641-1647.
24.Yu, J., Ahmedna, M., & Goktepe, I. (2007). Peanut protein concentrates: Production and functional properties as affected by processing. *Food Chemistry*, 103: 1. 121–129.
25.Zayas, J.F. (1997). Functionality of proteins in foods. *Berlin: Springer- Verlag*, 1-228.
26.Zhu, K.X, Zhou, H.M, & Qian, H. (2006a). Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. *Process Biochemistry*, 41, 1296-1302.
27.Zhu, K.X., Zhou, H.M., & Qian, H.F. (2006b). Proteins Extracted from Defatted Wheat Germ: Nutritional and Structural Properties. *Cereal Chemistry*, 83: 1. 69-75.

Iranian Association of Food Scientists and Technologists

EJFPP, Vol. 2 (4): 71-86
http://ejfpp.gau.ac.ir

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Evaluation of solubility properties and electrophoretic patterns of wheat germ proteins

[1]M. Rahbari[1], M. Aalami[2], Y. Maghsoudlou[2] and M. Kashaninejad[2]

[1]M.Sc. Student, Dept. of Food Science and Technology, University of Gorgan,
[2]Associate Prof., Dept. of Food Science and Technology, University of Gorgan

Received: 2012-02-11; Accepted: 2012-5-13

Abstract

Wheat germ is one of main part of wheat kernel that contains relatively high protein content. These proteins cause desired functional properties. Among the functional properties of proteins, solubility is of the most importance, because of its significant influence on the other functional properties. Many factors affect the protein solubility. Two of the most important factors are pH and NaCl concentration. In the alkaline extraction method, maximum solubility of proteins is important and affects the extraction efficiency. An integrate study was conducted on the effects of salt concentration and pH on the solubility of defatted wheat germ proteins. The solubility profile of defatted wheat germ protein also determined as affected by pH 1-12. The solubility at acidic pH values decreased towards the pH value of 4, that is the isoelectric point and then increased for basic pH values, and then solubility reached to maximum level at pH 10. The solubility was determined experimentally in the 0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 and 1 M NaCl solutions and pH 9, 9.5, 10, 10.5, in order to obtain optimum pH and salt concentration for protein extraction. The results showed that, both salt concentration and pH influenced in the protein solubility, and these properties had great interaction. The protein solubility was higher at pH value of 10 than other pH for all NaCl solutions, however, the maximum solubility was observed at pH 10 in 0.5 M NaCl concentration. The results of the present study indicated that the protein solubility of the defatted wheat germ flour was adversely affected by increasing ionic strength, although the protein solubility in 0.1 to 0.5 M NaCl solutions was similar nearly. The highest protein solubility was observed in 0.5 M NaCl and pH 10. Therefore, it can be concluded that optimum pH and salt concentration for protein extraction from defatted wheat germ are 10 and 0.5 M, respectively. Also, in order to understand the protein subunits distribution profile, and comparison structure of protein isolate from alkaline extraction and defatted wheat germ flour, electrophoresis patterns were determined.

Keywords: Wheat germ protein; Solubility; pH;Salt concentration; Electrophoresis.

---

*Corresponding Author; Email: rahbari.mahshid@yahoo.com