

بررسی ویژگی‌های عملکردی و ساختاری ایزوله‌ی پروتئین نخود اصلاح شده با استفاده از فرآیند اولتراسوند با شدت بالا

فرشته بهمنیار^۱، سهند سهرابی^۳، میترا پاشائی^۴، لیلا میرمقتدایی^۵

۱- کمیته تحقیقات دانشجویی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۲- مرکز تحقیقات سلامت پسته، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران

۳- دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه و صنایع غذایی کشور، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۴- دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه و صنایع غذایی کشور، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۵- نویسنده مسئول: دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه و صنایع غذایی کشور، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران. پست الکترونیک: Mirmoghtadaie@sbmu.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۱/۱۹

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۸/۴

چکیده

سابقه و هدف: پروتئین نخود به عنوان یک منبع پروتئینی گیاهی با خاصیت آلرژی‌زایی کم، غیرتراربخته، ارزان، با ارزش غذایی بالا و دسترسی گسترده، توجه زیادی را به خود جلب کرده است؛ اما خواص عملکردی محدودی دارد. فرآیند اولتراسوند با شدت بالا می‌تواند ویژگی‌های عملکردی و ساختاری را به دلیل اثرات کاویتاسیون در پروتئین‌های گیاهی بهبود بخشد. هدف از این مطالعه بررسی اثرات فرآیند اولتراسوند با شدت بالا بر ویژگی‌های عملکردی و ساختاری ایزوله پروتئین نخود است.

مواد و روش‌ها: نمونه‌ای حاوی ایزوله پروتئین نخود و آب تهیه (۵/۷ w/v) و توسط امواج اولتراسوند با فرکانس ثابت ۲۰ هرتز و قدرت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ وات به مدت ۱۰ دقیقه اصلاح شدند و سپس ویژگی‌های آن‌ها ارزیابی گردید.

یافته‌ها: فرآیند اولتراسوند سبب افزایش معنی‌دار فعالیت امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون ایزوله‌های پروتئین نخود شد ($P < 0.05$). اصلاح ایزوله‌ی پروتئین نخود توسط امواج اولتراسوند با قدرت ۳۰۰ وات به مدت ۱۰ دقیقه سبب افزایش حلالیت پروتئین در محدوده $4 < \text{pH} < 6$ نسبت به نمونه اصلاح نشده شد؛ همچنین این نمونه بالاترین شاخص L^* و پایین‌ترین شاخص a^* و b^* را نشان داد ($P < 0.05$). علاوه بر این، طیف FTIR تغییر در ساختار ثانویه ایزوله پروتئین نخود را پس از اعمال اولتراسوند نشان داد؛ و تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) نشان داد که شکل کروی ایزوله پروتئین نخود پس از اصلاح به ساختارهای ورقه‌ای ناهمگن تبدیل شده است.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج این مطالعه، فرآیند اولتراسوند با شدت بالا در قدرت ۳۰۰ وات به مدت ۱۰ دقیقه می‌تواند سبب بهبود ویژگی‌های عملکردی و ساختاری ایزوله‌ی پروتئین نخود شود.

واژگان کلیدی: ایزوله‌ی پروتئین نخود، اولتراسوند با شدت بالا، ویژگی‌های عملکردی و ساختاری

پیام‌های اصلی

- پروتئین نخود به عنوان یک منبع پروتئینی گیاهی با خاصیت آلرژی‌زایی کم، غیرتراریخته، ارزان، با ارزش غذایی بالا، و دسترسی گسترده، توجه زیادی را به خود جلب کرده است.
- فرآیند اولتراسوند با شدت بالا می‌تواند ویژگی‌های عملکردی و ساختاری را به دلیل اثرات کاویتاسیون در پروتئین‌های گیاهی بهبود بخشد.
- اولتراسوند سبب افزایش فعالیت امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون ایزوله‌های پروتئین نخود می‌شود.
- اولتراسوند سبب تغییر در ساختار ثانویه ایزوله پروتئین نخود (طیف FTIR)، و سبب تغییر شکل کروی ایزوله پروتئین نخود به ساختارهای ورقه‌ای ناهمگن (SEM) می‌شود.

• مقدمه

پروتئین‌های گیاهی به دلیل داشتن ارزش غذایی نسبتاً بالا و هزینه نسبتاً پایین به طور گسترده به عنوان یک جزء تشکیل‌دهنده در غذاها مورد استفاده قرار می‌گیرند. در میان پروتئین‌های گیاهی، پروتئین نخود (Pea protein)، ۱۰/۳ میلیون تن از کل تولیدات جهانی پروتئین‌های گیاهی را تشکیل می‌دهد و پتانسیل بالایی به عنوان یک ماده‌ی کاربردی در صنعت غذا دارد (۱). علاوه بر این پروتئین نخود به دلیل ارزش غذایی بالا، آلرژی‌زایی کم، غیرتراریخته بودن، هزینه کم و دسترسی گسترده، در سال‌های اخیر توجه زیادی را به خود جلب کرده است (۲). ایزوله‌ی پروتئین نخود پروفایل متعادلی از اسیدهای آمینه، به ویژه محتوای بالای لیزین را نشان می‌دهد؛ با وجود این واقعیت که ایزوله‌ی پروتئین نخود یک منبع تغذیه‌ای عالی است، کاربرد آن در تکنولوژی‌های غذایی به دلیل خواص کم عملکردی آن محدود می‌باشد (۱). خواص عملکردی پروتئین نخود را می‌توان با استفاده از تکنیک‌های فرآوری مواد غذایی بهبود بخشید (۳). یکی از این تکنیک‌ها، فرآیند اولتراسوند است که در صنایع غذایی توجه زیادی را به خود جلب کرده است (۴). اولتراسوند یک جایگزین سریع، کارآمد و قابل اعتماد برای بهبود کیفیت مواد غذایی است که پتانسیل توسعه محصول جدید با عملکرد منحصر به فرد را دارا می‌باشد (۱).

اولتراسوند با شدت بالا به عنوان یک موج صوتی با فرکانس بیش از ۲۰ کیلو هرتز، کاربردهای متنوعی در صنایع غذایی دارد، که می‌تواند خواص فیزیکیوشیمیایی و یا ویژگی‌های ساختاری و خواص عملکردی را به دلیل اثرات کاویتاسیون در پروتئین‌های گیاهی تغییر دهد (۵، ۶). فرآیند اولتراسوند با شدت بالا، از طریق کاویتاسیون منجر به شکست تجمعات پروتئینی، کاهش اندازه و در نتیجه برهمکنش‌ها می‌شود و در نهایت ساختار پروتئین تغییر می‌یابد (۷، ۸). تغییر در ساختار پروتئین با استفاده از فرآیندهای اولتراسوند موجب در معرض قرارگیری بیشتر گروه‌های واکنشگر مانند گروه‌های آبگریز و

سولفیدریل، روی سطح مولکول پروتئین می‌شود که می‌تواند با بهبود خواص عملکردی پروتئین، مانند حلالیت، امولسیون‌کنندگی و ظرفیت کف‌کنندگی مرتبط باشد (۹). در این زمینه، بسیاری از مطالعات گذشته گزارش کرده‌اند که فرآیند اولتراسوند پتانسیل خوبی برای اصلاح خواص عملکردی پروتئین‌های گیاهی می‌باشد. Hu و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که فرآیند اولتراسوند منجر به باز شدن جزئی، و بهبود حلالیت و ویژگی سیالیت ایزوله پروتئین سویا می‌شود (۴). علاوه بر این، Morales و همکاران (۲۰۱۵) دریافتند که فرآیند اولتراسوند با شدت بالا، ظرفیت کف‌کنندگی ایزوله پروتئین سویا را با تغییر اندازه ذرات بهبود می‌بخشد در حالی که پایداری آن به طور قابل توجهی تغییر نمی‌کند (۱۰). بهبود حلالیت، خواص امولسیون‌کنندگی، ظرفیت کف‌کنندگی و پایداری کف ایزوله‌های پروتئین آفتابگردان ناشی از فرآیند اولتراسوند توسط Malik و همکاران (۲۰۱۷) مشاهده گردید (۱۱). بنابراین، این مطالعه با هدف بررسی اثرات فرآیند اولتراسوند با شدت بالا بر ویژگی‌های عملکردی و ساختاری ایزوله پروتئین نخود انجام شده است. جهت دستیابی به این هدف، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه تحت فرآیند اولتراسوند در سه سطح ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ وات قرار می‌گیرند و در نهایت مطلوب‌ترین سطح از فرآیند انتخاب می‌گردد.

• مواد و روش‌ها

اصلاح ایزوله پروتئین نخود: به منظور اصلاح ایزوله پروتئین نخود با کمک امواج اولتراسوند، ابتدا دیسپرسیون ۵٪ وزنی حجمی (w/v) ایزوله پروتئین نخود در آب مقطر تهیه و کاملاً همزده شد و به مدت یک شب به منظور هیدراته شدن کامل پروتئین در دمای یخچال نگهداری شد. سپس دیسپرسیون ایزوله پروتئین نخود تحت امواج دستگاه اولتراسوند پروب‌دار (UP-400-A, Iran) با فرکانس ثابت ۲۰ KHz و قدرت‌های ۱۰۰w، ۲۰۰، ۳۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه با حداکثر دمای تنظیمی ۳۵ °C قرار گرفتند (۸). پس از اصلاح، دیسپرسیون ایزوله‌های

خوانش دستگاه به منظور تعیین پارامترهای L^* (Lightness)، a^* (Redness) و b^* (Yellowness) انجام گرفت (۱۴).

تعیین ویژگی‌های ساختاری (FT-IR): ویژگی‌های ساختاری ایزوله پروتئین نخود با دستگاه Fourier-Transform Infrared Spectroscopy بررسی شد. طیف‌سنجی نمونه‌های ایزوله پروتئین نخود با استفاده از یک طیف‌سنج (Agilent, FT-IR, Cary 630 FTIR, US) در محدوده $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ و وضوح 8 cm^{-1} ثبت شد (۱۵).

تعیین مورفولوژی (SEM): مورفولوژی پودر ایزوله پروتئین نخود با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (Scanning Electron Microscopy, SEM) (TESCAN, MIRA 3 LMU) با ولتاژ شتاب دهنده ۱۵ کیلو ولت مشاهده گردید. سطوح نمونه‌ها قبل از گرفتن عکس با طلا پوشانده شد (۱).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: تمام آزمون‌ها با سه بار تکرار انجام و تجزیه و تحلیل داده‌ها با کمک نرم‌افزار SPSS ۲۵ مورد ارزیابی قرار گرفتند و نتایج به صورت میانگین و انحراف معیار ارائه شدند.

به منظور مقایسه نتایج به دست آمده از آزمون‌ها، بعد از بررسی نرم‌الیتی داده‌ها، از آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) استفاده گردید؛ همچنین بعد از مشاهده اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها، از آزمون دانکن (Duncan's Multiple Range Tests) جهت مقایسه داده‌ها استفاده گردید. لازم به ذکر است که تمامی مراحل تجزیه و تحلیل، در سطح معنی‌داری $(\alpha=0/05)$ انجام شد.

• یافته‌ها

نتایج حلالیت ایزوله پروتئین نخود در pH های مختلف: نتایج حاصل از حلالیت ایزوله پروتئین نخود در pH های ۱۰، ۸، ۶، ۴ و ۲ در شکل ۱ نشان داده شده است. به طور کلی کمترین حلالیت در pH برابر ۴ برای همه نمونه‌های ایزوله پروتئین نخود ثبت شد، و با کاهش یا افزایش مقدار pH از عدد ۴، میزان حلالیت ایزوله پروتئین نخود افزایش یافت. علاوه بر این همان‌طور که مشاهده می‌گردد اصلاح پروتئین با استفاده از فرآیند اولتراسوند با قدرت ۳۰۰ وات به مدت ۱۰ دقیقه (UP300) منجر به افزایش چشمگیر حلالیت پروتئین در pH های پایین‌تر از ۴ و بالاتر از ۶ نسبت به نمونه اصلاح نشده (NP) گردید.

نتایج فعالیت امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون ایزوله پروتئین نخود: نتایج به دست آمده از فعالیت امولسیون‌کنندگی (EAI) و پایداری امولسیون (ESI) ایزوله پروتئین نخود در شکل ۲ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده

پروتئینی توسط خشک کن انجمادی خشک شدند و جهت ارزیابی‌های بیشتر در یخچال نگهداری شدند.

تعیین حلالیت در pH های مختلف: ابتدا دیسپرسیون‌های پروتئینی با استفاده از پودر ایزوله پروتئین نخود در آب دیونیزه با غلظت نهایی ۱٪ (w/v) تهیه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق همزده شدند؛ سپس pH نمونه‌ها با استفاده از محلول‌های NaOH یا HCL در pH های ۱۰، ۸، ۶، ۴، ۲ تنظیم شدند و به مدت یک ساعت در pH مورد نظر کاملاً همزده شدند. در انتها نمونه‌ها با سرعت ۹۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی خارج شد و رسوب‌های ته‌نشین شده در آون تحت خلاء خشک شدند (۱۲). حلالیت طبق معادله زیر محاسبه گردید:

$$100 \times \text{وزن اولیه} / (\text{وزن رسوب خشک} - \text{وزن اولیه}) = \text{حلالیت} (\%)$$

تعیین فعالیت امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون: ۳۰ میلی‌لیتر از دیسپرسیون ایزوله پروتئین نخود (۵ میلی گرم در میلی‌لیتر) به ۱۰ میلی‌لیتر روغن کانولا اضافه گردید و با استفاده از هموژنایزر سرعت بالا با دور ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲ دقیقه همگن شدند (IKA T25 Digital Ultra-Turrax). بلافاصله ۱۰۰ میکرولیتر امولسیون از قسمت انتهایی بشر برداشته شد و به ۱۰ میلی‌لیتر محلول سدیم دو سولفات (SDS) ۰/۱٪ اضافه شد و جذب در طول موج ۵۰۰ نانومتر با کمک دستگاه اسپکتروفتومتر (PERKIN ELMER, Lambda 2) ثبت شد. مجدداً پس از ۱۰ دقیقه، ۱۰۰ میکرولیتر امولسیون از انتهای بشر برداشته شد و به ۱۰ میلی‌لیتر محلول سدیم دو سولفات (SDS) ۰/۱٪ اضافه و جذب در طول موج ۵۰۰ نانومتر خوانده شد (۱۳). محلول SDS به صورت بلانک معرفی شد و فعالیت امولسیون‌کنندگی (EAI) و پایداری امولسیون (ESI) با کمک معادله‌های زیر محاسبه گردید:

$$EAI \text{ (m}^2/\text{g)} = (2 \times 2/3 \times A_0 \times D) / (10^4 \times c \times \phi)$$

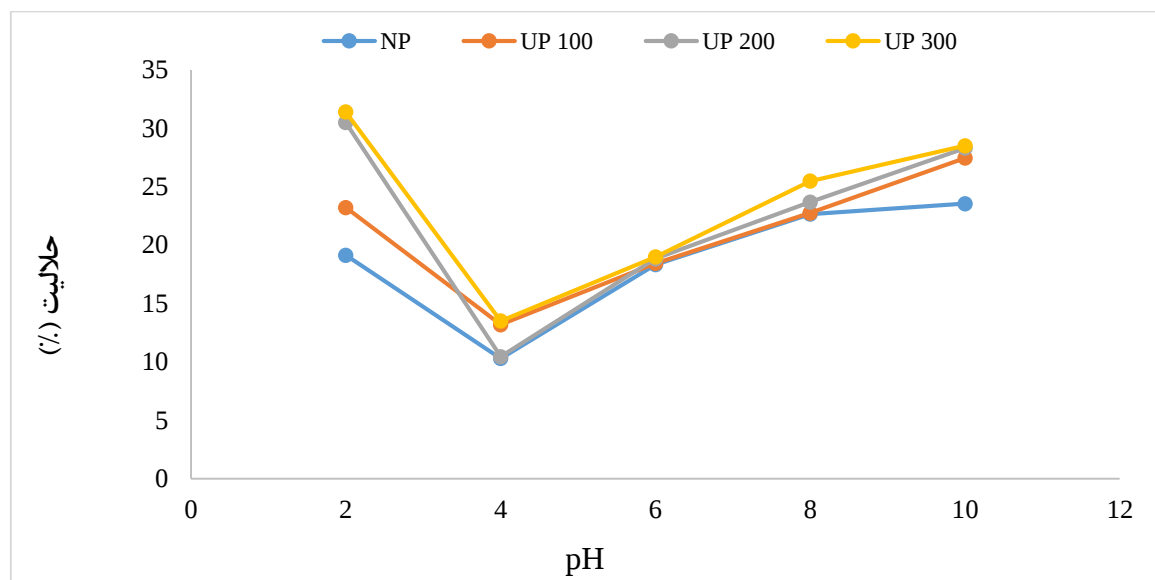
$$ESI \text{ (min)} = (A_0 \times t_{10}) / (A_0 \times A_{10})$$

طبق معادله بالا A_0 نشان دهنده جذب در زمان صفر است، D ضریب رقت (۱۰۰)، c غلظت پروتئین قبل از تشکیل امولسیون (g/mL)، ϕ کسر حجمی روغن در سیستم امولسیونی (۰/۲۵)، t_{10} مدت زمان پس از خوانش جذب اول (۱۰)، A_{10} جذب پس از ۱۰ دقیقه است.

تعیین رنگ: رنگ با کمک دستگاه رنگ‌سنج (Hunter Lab) (Color Flex EZ; Made in USA) اندازه‌گیری شد. ظرف شیشه‌ای مخصوص دستگاه رنگ سنج با مقادیر یکسان از پودر ایزوله پروتئین نخود پر شد و سپس رنگ نمونه‌ها با سه بار

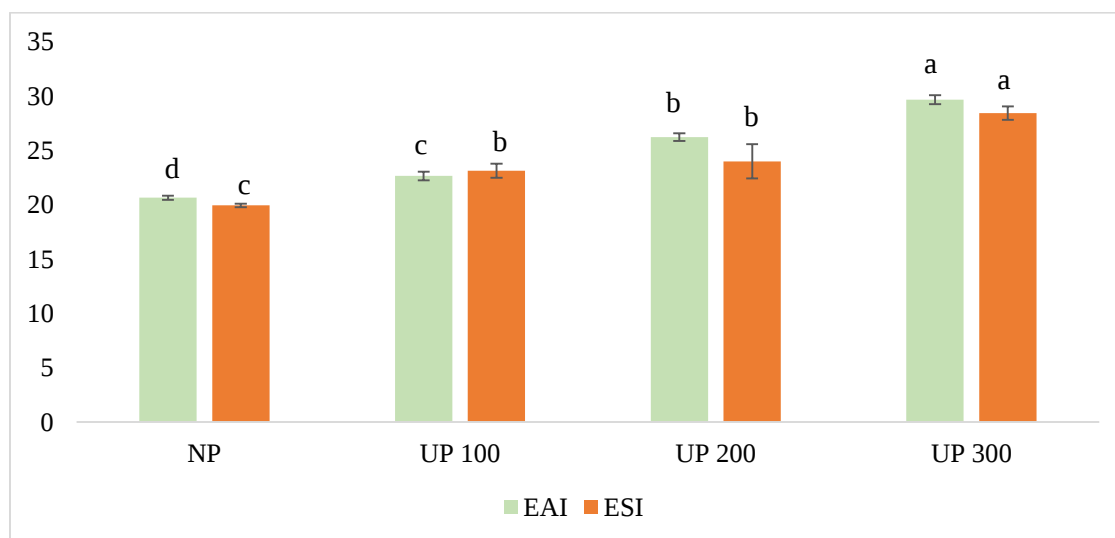
نشده به $29/68 \text{ (m}^2/\text{g)}$ در نمونه UP300 افزایش یافت ($P < 0/05$). همچنین پایداری امولسیون ایزوله پروتئین نخود پس از فرآیند اولتراسوند افزایش یافت و از $19/95 \text{ (min)}$ در نمونه اصلاح نشده به $28/45 \text{ (min)}$ در نمونه UP300 رسید ($P < 0/05$).

می‌گردد، با افزایش قدرت اولتراسوند، میزان فعالیت امولسیون کنندگی نمونه‌ها به طور معنی‌دار افزایش یافت ($P < 0/05$)، و بالاترین فعالیت امولسیون کنندگی در نمونه اصلاح شده با قدرت ۳۰۰ وات به مدت ۱۰ دقیقه (UP300) مشاهده شد. فعالیت امولسیون کنندگی از $20/66 \text{ (m}^2/\text{g)}$ در نمونه اصلاح



شکل ۱. حلالیت ایزوله پروتئین نخود در pH های مختلف

NP: ایزوله پروتئین نخود اصلاح نشده، UP100: ایزوله پروتئین نخود اصلاح شده با US (۱۰۰ W، ۱۰ min)، UP200: ایزوله پروتئین نخود اصلاح شده با US (۲۰۰ W، ۱۰ min)، UP300: ایزوله پروتئین نخود اصلاح شده با US (۳۰۰ W، ۱۰ min)



شکل ۲. نتایج فعالیت امولسیون کنندگی و پایداری امولسیون ایزوله پروتئین نخود

حروف غیرمشابه در هر ستون برای هر ویژگی ایزوله پروتئین نخود، بیانگر وجود اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد خطا است.

معنی‌دار وجود دارد ($P < 0/05$). نمونه UP 300 بالاترین شاخص L^* و پایین‌ترین شاخص a^* و b^* را نشان داد ($P < 0/05$).
نتایج ویژگی‌های ساختاری (FT-IR) ایزوله پروتئین نخود: نتایج طیف‌سنجی مادون قرمز در بازه ۴۰۰ تا 4000 cm^{-1} برای ایزوله پروتئین نخود اصلاح شده با اولتراسوند

نتایج رنگ ایزوله پروتئین نخود: نتایج حاصل از اندازه‌گیری رنگ ایزوله پروتئین نخود در جدول ۱ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌گردد بین نمونه‌های اصلاح شده با اولتراسوند و اصلاح نشده از نظر پارامترهای L^* ، a^* و b^* تفاوت

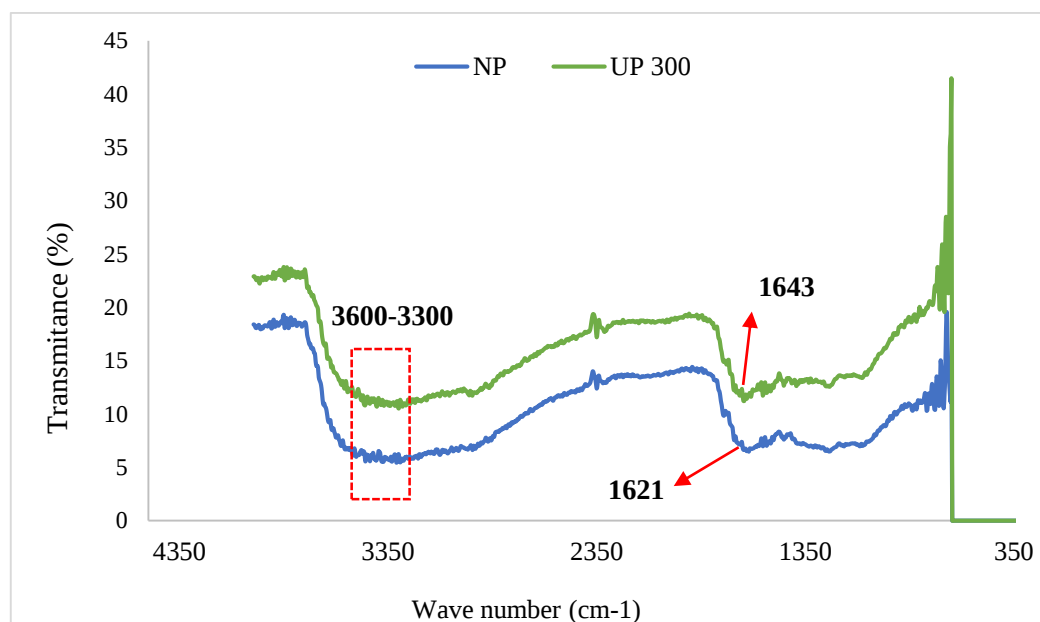
یافت. همچنین تغییر در موقعیت قرارگیری و/یا ناپدید شدن پیک‌ها در منطقه 3300 تا 3600 cm^{-1} پس از فرآیند اولتراسوند مشاهده گردید.

(UP300) و اصلاح نشده (NP) در شکل ۳ نشان داده شده است. مطابق با شکل، باند آمید I از $1621/39\text{ cm}^{-1}$ در نمونه اصلاح نشده (NP) به $1643/76\text{ cm}^{-1}$ در نمونه UP300 تغییر موقعیت

جدول ۱. نتایج رنگ ایزوله پروتئین نخود

Yellowness (b*)	Redness (a*)	Lightness (L*)	
$22/77 \pm 0.06^c$	$2/98 \pm 0.00^c$	$82/88 \pm 0.06^b$	NP
$25/99 \pm 0.06^a$	$4/43 \pm 0.06^b$	$77/48 \pm 0.06^c$	UP 100
$25/45 \pm 0.10^b$	$4/50 \pm 0.06^a$	$77/16 \pm 0.06^d$	UP 200
$20/35 \pm 0.00^d$	$2/24 \pm 0.06^d$	$84/29 \pm 0.06^a$	UP 300

*حروف غیرمشابه در هر ستون بیانگر وجود اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد خطا است.

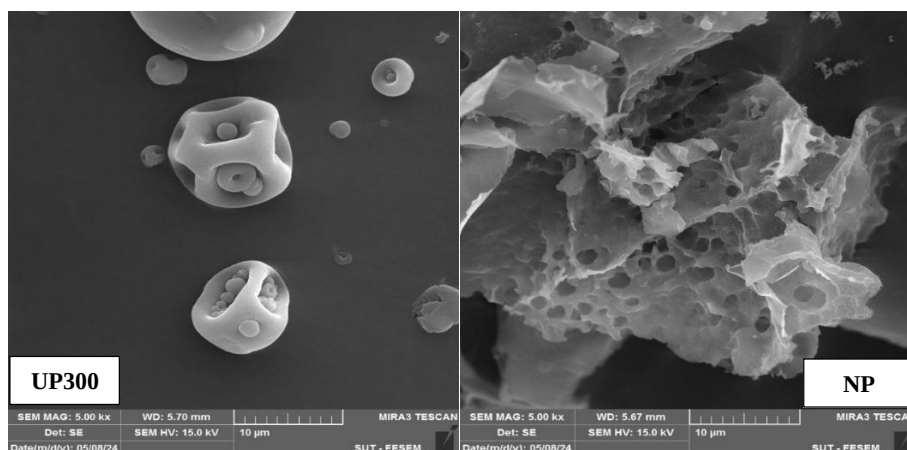


شکل ۳. طیف FTIR ایزوله پروتئین نخود اصلاح شده و اصلاح نشده

NP: ایزوله پروتئین نخود اصلاح نشده، UP300: ایزوله پروتئین نخود اصلاح شده با US (۱۰min، ۳۰۰W)

اصلاح نشده دارای شکل کروی با فرورفتگی‌های بزرگ است که پس از اصلاح با اولتراسوند این ساختار از بین رفته است و به ساختارهای ورقه‌ای ناهمگن تبدیل شدند. همچنین، ایزوله پروتئین نخود اصلاح نشده سطح صافی نشان داد، اما نمونه اصلاح شده (UP300) سطح ناهموار با لبه‌های تیز نشان داد.

نتایج مورفولوژی (SEM) ایزوله پروتئین نخود: شکل ۴ تغییرات در میکروساختار ایزوله پروتئین نخود را قبل و بعد از اصلاح با استفاده از فرآیند اولتراسوند توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) نشان می‌دهد. ایزوله پروتئین نخود



شکل ۴. تصویر SEM ایزوله پروتئین نخود اصلاح شده و اصلاح نشده با بزرگنمایی ۵ Kx
NP: ایزوله پروتئین نخود اصلاح نشده، UP300: ایزوله پروتئین نخود اصلاح شده با US (۱۰min, ۳۰۰W)

• بحث

حلالیت ایزوله پروتئین نخود در pH های مختلف: کمترین حلالیت در تمام نمونه‌های ایزوله پروتئین نخود در pH ۴ مشاهده گردید. زیرا این مقدار pH در محدوده pH ایزوالکتریک پروتئین می‌باشد. پروتئین‌ها در آن محدوده از pH، مقادیر پتانسیل زتا نزدیک به صفر دارند؛ به این ترتیب، تجمع پروتئین از طریق برهمکنش‌های قوی بین مولکولی به دلیل عدم وجود بار پروتئین رخ داده و منجر به حلالیت ضعیف پروتئین شده است (۱۶، ۱۷). به بیان دیگر، حلالیت پروتئین‌ها در $pH < 4$ در تمامی نمونه‌ها افزایش یافت؛ از آنجایی که پروتئین‌ها در این محدوده از pH باردار هستند، دافعه الکترواستاتیک بین مولکول‌های پروتئین از تجمع پروتئین جلوگیری می‌نماید و در نتیجه حلالیت پروتئین افزایش می‌یابد (۱۶).

علاوه بر این، افزایش چشمگیر حلالیت در نمونه UP300 نسبت به نمونه اصلاح نشده (NP) در pH های پایین‌تر از ۴ و بالاتر از ۶ می‌تواند به دلیل کاهش اندازه ذرات، باز شدن ساختار پروتئین و در نهایت افزایش برهمکنش‌های پروتئین-آب پس از اعمال فرآیند اولترا سوند باشد. در این رابطه، Malik و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که تبدیل تجمعات نامحلول به محلول و تغییر در پیکربندی پروتئین منجر به افزایش حلالیت پروتئین آفتابگردان پس از اصلاح با اولتراسوند شد (۱۱). همچنین Gao و همکاران (۲۰۲۲) بیان کردند که حلالیت ایزوله پروتئین نخود فرنگی تجاری پس از اصلاح اولتراسوند با قدرت ۱۵۰ وات از ۷/۲ به ۵۸/۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر افزایش یافته است (۱۸). نتایج مشابهی برای حلالیت ایزوله پروتئین سویا (۱۹)، ایزوله پروتئین آفتابگردان (۱۱) و ایزوله پروتئین نخود فرنگی (۲۰) پس از اصلاح با اولتراسوند گزارش شده است. همچنین در این زمینه، Higuera-Barraza و همکاران (۲۰۱۶) گزارش دادند که

اولتراسوند با شدت بالا تکنیک مفیدی برای بهبود حلالیت پروتئین و سایر خواص عملکردی براساس ویژگی‌های ذاتی آن-ها می‌باشد (۲۱).

فعالیت امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون ایزوله پروتئین نخود: خواص امولسیون‌کنندگی، توانایی جذب پروتئین در سطح مشترک روغن/آب را نشان می‌دهد و به ویژگی‌های پروتئین مانند آگریزی سطحی، بار سطحی، حلالیت و انعطاف‌پذیری مولکولی بستگی دارد (۲۲). افزایش فعالیت امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون ایزوله پروتئین نخود پس از اولتراسوند می‌تواند به دلیل کاهش اندازه پروتئین‌ها، تغییرات در ساختار پروتئین، باز شدن ساختار پروتئین و افزایش برهمکنش‌های آگریز-آبدوست باشد. در این زمینه، Mastani و همکاران (۲۰۲۳) بیان کردند که فرآیند اولتراسوند و پدیده کاویتاسیون باعث کاهش اندازه ذرات، باز شدن ساختار پروتئین و افزایش آگریزی می‌شود که منجر به افزایش سطح مشترک روغن-آب و تغییر در خواص امولسیون‌کنندگی پروتئین می‌گردد (۲۲). علاوه بر این، Nazari و همکاران (۲۰۱۸) افزایش فعالیت امولسیون‌کنندگی کنسانتره پروتئین ارزن پس از اولتراسوند را ناشی از باز شدن و تغییر شکل زنجیره‌های پروتئینی، افزایش تماس قسمت‌های آبدوست توسط جریان اغتشاشی بوجود آمده بوسیله فرایند کاویتاسیون گزارش نمودند که موجب بهبود خصوصیات امولسیون‌کنندگی پروتئین می‌گردد (۲۳).

رنگ ایزوله پروتئین نخود: تغییر پارامترهای رنگی ایزوله پروتئین نخود در اثر فرآیند اولتراسوند، می‌تواند به دلیل تغییر رنگدانه‌های موجود در پروتئین نخود در اثر ایجاد کاویتاسیون در فرآیند اولتراسوند باشد (۲۴). همسو با این نتایج، Mir و همکاران (۲۰۱۹) گزارش کردند که شاخص L^* ایزوله پروتئین

دانه آلبوم (Album Seed) پس از اعمال اولتراسوند افزایش یافت؛ همچنین دریافتند، تغییر در ویژگی‌های رنگی ایزوله‌های پروتئینی اصلاح شده با امواج اولتراسوند ارتباط نزدیکی با میزان زمان اولتراسوند دارد. اولتراسوند از طریق آزادسازی رنگدانه‌ها و یا تخریب مکان‌هایی که حاوی رنگدانه‌ها هستند می‌تواند تأثیر مثبت یا منفی بر رنگدانه‌های موجود در اجزای غذایی داشته باشد (۲۴). همچنین Qin و همکاران (۲۰۲۴) مشاهده کردند پارامتر روشنایی (L^*) در پروتئین آفتابگردان پس از استخراج از کنجاله آفتابگردان با استفاده از ماکرو-رزین‌های متخلل به همراه فرآیند اولتراسوند افزایش یافت (۲۵).

علاوه بر این، کاهش سایز ذرات می‌تواند منجر به پراکندگی بیشتر نور و افزایش شاخص L^* در نمونه شود. بنابراین در این مطالعه نمونه UP300 با سایز کوچک‌تر منجر به پراکندگی بیشتر نور و افزایش شاخص L^* شد. این نتیجه، نتایج مشاهده شده مربوط به تصاویر سایز ذرات پس از عکسبرداری که در ادامه ذکر شده است را تایید می‌کند. همچنین کاهش شاخص های a^* و b^* در نمونه UP300 بیانگر این است که اعمال فرآیند اولتراسوند با قدرت ۳۰۰ وات به مدت ۱۰ دقیقه می‌تواند سبب کاهش رنگدانه‌های زرد ایزوله پروتئین نخود و کاهش زردی نمونه اصلاحی شود. این نتایج منجر به استفاده بیشتر از این نوع پروتئین اصلاح شده در محصولاتی می‌شود که وجود رنگ زرد ایزوله پروتئین نخود نامطلوب در نظر گرفته می‌شود.

ویژگی‌های ساختاری (FT-IR) ایزوله پروتئین نخود:

ترکیبات مختلف به دلیل ساختارهای مولکولی متفاوت، جذب مادون قرمز متفاوتی دارند، بنابراین طیف جذب مادون قرمز متفاوتی را هم ثبت می‌کنند (۸). به همین دلیل است که طیف FTIR می‌تواند تفاوت‌های ساختاری بین نمونه‌های مختلف را نشان دهد (۲۶). باندهای اصلی و مهم در طیف FT-IR پروتئین که برای تشخیص ساختارهای ثانویه استفاده می‌شوند شامل آمید I و آمید II هستند (۲۷). باند آمید I محدوده طول موج $1600-1700 \text{ cm}^{-1}$ را پوشش می‌دهد و مربوط به ارتعاشات کششی پیوند $C=O$ است و باند آمید II در محدوده طول موج $1480-1575 \text{ cm}^{-1}$ جذب می‌شود و در درجه اول ارتعاشات خمشی پیوند $N-H$ را نشان می‌دهد (۲۷، ۲۸). از آنجایی که پیوندهای $C=O$ و $N-H$ در تشکیل پیوندهای هیدروژنی بین عناصر مختلف ساختار ثانویه پروتئین نقش دارند، تغییرات در موقعیت باندهای آمید I و آمید II نشان دهنده تغییرات در ساختار ثانویه پروتئین می‌باشد (۲۷). همانطور که در شکل ۳ نشان داده شده است، طیف پیک آمید I از $1621/39 \text{ cm}^{-1}$ در ایزوله پروتئین نخود اصلاح نشده به $1643/76 \text{ cm}^{-1}$ پس از فرآیند اولتراسوند (UP300) تغییر کرد.

علاوه بر این، پیک‌های موجود در محدوده طول موج 3300 تا 3600 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی $O-H$ و $N-H$ هستند و برای ارزیابی شدت پیوندهای هیدروژنی درون مولکولی و بین مولکولی استفاده شدند (۲۹). بنابراین تغییرات در محل و/یا ناپدید شدن پیک‌ها در ناحیه 3300 تا 3600 cm^{-1} پس از اعمال فرآیند اولتراسوند مربوط به تغییرات پیوندهای هیدروژنی است. در این راستا، Mastani و همکاران (۲۰۲۳) گزارش دادند که فرآیند اولتراسوند و مایکروویو منجر به تغییر در ساختار ثانویه گلوتن و وی پروتئین شده است (۲۲). بنابراین، نتایج طیف‌سنجی FTIR در مطالعه حاضر نشان داد که پیوندهای هیدروژنی و ساختار ثانویه ایزوله پروتئین نخود پس از اصلاح از طریق فرآیند اولتراسوند تغییر کرده‌اند.

مورفولوژی ایزوله (SEM) پروتئین نخود: فرآیند اولتراسوند موجب تغییر ساختار کروی ایزوله پروتئین نخود به ساختارهای ورقه‌ای ناهمگن و کاهش اندازه ذرات پروتئین در مقایسه با ذرات ایزوله پروتئین نخود اصلاح نشده، گردید. در رابطه با اندازه ذرات پروتئین، Hu و همکاران (۲۰۱۵) بیان کردند که اندازه ذرات پروتئین کاملاً بر خواص عملکردی پروتئین تأثیر می‌گذارد (۳۰). بنابراین در مطالعه حاضر کاهش اندازه ذرات پروتئین پس از فرآیند اولتراسوند از طریق افزایش سطح پروتئین می‌تواند سبب بهبود ویژگی‌های عملکردی این پروتئین‌های اصلاحی در مقایسه با نمونه اصلاح نشده شود که این تئوری در نتایج آزمون‌های قبلی مشاهده گردید.

علاوه بر این، فرآیند اولتراسوند سبب شد سطح صاف ایزوله پروتئین نخود پس از اصلاح به سطوح ناهموار و خشن با لبه‌های تیز تبدیل شود. مطابق با این نتایج، Xiong و همکاران (۲۰۱۸) مشاهده کردند که فرآیند اولتراسوند منجر به ایجاد ذرات پروتئینی کوچک‌تر شد و با افزایش شدت اولتراسوند ذرات ریزتر و منظم‌تر شدند؛ و گزارش نمودند که این کاهش اندازه ذرات در ایزوله پروتئین نخود ممکن است به دلیل کاویتاسیون ایجاد شده توسط پروب باشد (۱).

نتیجه گیری

در این مطالعه، ایزوله‌ی پروتئین نخود تحت فرآیند اولتراسوند با قدرت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ وات به مدت ۱۰ قرار گرفت و نتایج نشان داد که اولتراسوند در تمام سطوح منجر به افزایش فعالیت امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون که از ویژگی‌های عملکردی ایزوله‌ی پروتئین نخود است، می‌شود. ایزوله‌ی پروتئین نخود اصلاح شده توسط اولتراسوند با قدرت ۳۰۰ وات به مدت ۱۰ دقیقه حلالیت بیشتری در محدوده $pH < 4$ نسبت به نمونه اصلاح نشده نشان داد؛ همچنین این

اولتراسوند به عنوان یک فرآیند سبز برای بهبود خواص عملکردی ایزوله‌ی پروتئین نخود و تبدیل پروتئین اصلاح‌شده به یک ماده‌ی عملگر در صنایع غذایی مختلف از جمله نان، کیک، محصولات قنادی و فرآورده‌های گوشتی می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد.

تقدیر و تشکر: این مقاله حاصل طرح مصوب شورای پژوهشی کمیته تحقیقات و فناوری دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به شماره ثبت ۶۶۶۳۵/ص/۱۴۰۲ می‌باشد. از کمیته تحقیقات و فناوری دانشجویی، و معاونت تحقیقات و فن-آوری دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی برای حمایت مالی از این مطالعه قدردانی می‌شود.

نمونه بالاترین شاخص L^* و پایین‌ترین شاخص a^* و b^* را ثبت کرد ($P < 0.05$). طیف‌سنجی مادون قرمز (FTIR)، تغییرات در پیوندهای هیدروژنی و ساختار ثانویه ایزوله پروتئین نخود را پس از اصلاح توسط فرآیند اولتراسوند در قدرت ۳۰۰ وات به مدت ۱۰ دقیقه نشان داد؛ و تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) نشان داد که شکل کروی پروتئین نخود پس از اصلاح به ساختارهای ورقه‌ای ناهمگن تبدیل شده است. بنابراین، با توجه به نتایج بدست آمده از طیف‌سنجی مادون قرمز و تصاویر میکروسکوپی دریافتیم که فرآیند اولتراسوند می‌تواند روی ساختار پروتئین نخود هم اثر گذار باشد. بنابراین به طور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که فرآیند اولتراسوند در قدرت ۳۰۰ وات به مدت ۱۰ دقیقه می‌تواند سبب بهبود ویژگی‌های عملکردی و تغییر ساختار ایزوله‌ی پروتئین نخود شود و

• References

۱. Xiong T, Xiong W, Ge M, Xia J, Li B, Chen Y. Effect of high intensity ultrasound on structure and foaming properties of pea protein isolate. *Food Research International*. 2018;109:260-7.
۲. Bahmanyar F, Pashaei M, Nayebzadeh K, Dini A, Mirmoghtadaie L, Hosseini H. Techno-functionality of pea protein isolate: Influence of ultrasound and high-pressure homogenization modification methods. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2025;116:107321.
۳. Kumar P, Sharma N, Ahmed MA, Verma AK, Umaraw P, Mehta N, et al. Technological interventions in improving the functionality of proteins during processing of meat analogs. *Frontiers in nutrition*. 2022;9:1044024.
۴. Hu H, Wu J, Li-Chan EC, Zhu L, Zhang F, Xu X, et al. Effects of ultrasound on structural and physical properties of soy protein isolate (SPI) dispersions. *Food hydrocolloids*. 2013;30(2):647-55.
۵. Zhang L, Jin Y, Xie Y, Wu X, Wu T. Releasing polysaccharide and protein from yeast cells by ultrasound: Selectivity and effects of processing parameters. *Ultrasonics sonochemistry*. 2014;21(2):576-81.
۶. Resendiz-Vazquez J, Ulloa J, Urías-Silvas J, Bautista-Rosales P, Ramírez-Ramírez J, Rosas-Ulloa P, González-Torres L. Effect of high-intensity ultrasound on the technofunctional properties and structure of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed protein isolate. *Ultrasonics sonochemistry*. 2017;37:436-44.
۷. Jiang S, Ding J, Andrade J, Rababah TM, Almajwal A, Abulmeaty MM, Feng H. Modifying the physicochemical properties of pea protein by pH-shifting and ultrasound combined treatments. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2017;38:835-42.
۸. Li M, Yang R, Feng X, Fan X, Liu Y, Xu X, et al. Effects of low-frequency and high-intensity ultrasonic treatment combined with curdlan gels on the thermal gelling properties and structural properties of soy protein isolate. *Food Hydrocolloids*. 2022;127:107506.
۹. Yan J, Zhao S, Xu X, Liu F. Enhancing pea protein isolate functionality: A comparative study of high-pressure homogenization, ultrasonic treatment, and combined processing techniques. *Current Research in Food Science*. 2024;8:100653.
۱۰. Morales R, Martínez KD, Ruiz-Henestrosa VMP, Pilosof AM. Modification of foaming properties of soy protein isolate by high ultrasound intensity: Particle size effect. *Ultrasonics sonochemistry*. 2015;26:4.۵۵-۸.
۱۱. Malik MA, Sharma HK, Saini CS. High intensity ultrasound treatment of protein isolate extracted from dephenolized sunflower meal: Effect on physicochemical and functional properties. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2017;39:511-9.
۱۲. D'Alessio G, Flamminii F, Faieta M, Prete R, Di Michele A, Pittia P, Di Mattia CD. High pressure homogenization to boost the technological functionality of native pea proteins. *Current Research in Food Science*. 2023;6:100499.
۱۳. Yang J, Liu G, Zeng H, Chen L. Effects of high pressure homogenization on faba bean protein aggregation in relation to solubility and interfacial properties. *Food Hydrocolloids*. 2018;83:275-86.
۱۴. Bahmanyar F, Hosseini SM, Mirmoghtadaie L, Shojaei_Aliabadi S. Development of Functional Beef Burgers with Pseudocereals and Study of their Physicochemical and Textural Properties. *Research and Innovation in Food Science and Technology*. 2022;11(3):247-56.
۱۵. Zhao F, Zhang D, Li X, Dong H. High-pressure homogenization pretreatment before enzymolysis of soy protein isolate: the effect of pressure level on aggregation and structural conformations of the protein. *Molecules*. 2018;23(7):1775.
۱۶. Bučko S, Katona J, Popović L, Petrović L, Milinković J. Influence of enzymatic hydrolysis on solubility, interfacial and emulsifying properties of pumpkin (*Cucurbita pepo*) seed protein isolate. *Food Hydrocolloids*. 2016;60:271-8.
۱۷. Ong KS, Chiang JH, Sim SYJ, Liebl D, Madathummal M, Henry CJ. Functionalising insoluble pea protein

- aggregates using high-pressure homogenisation: Effects on physicochemical, microstructural and functional properties. *Food Structure*. 2022;34:100298.
۱۸. Gao K, Rao J, Chen B. Unraveling the mechanism by which high intensity ultrasound improves the solubility of commercial pea protein isolates. *Food Hydrocolloids*. 2022;131:107823.
 ۱۹. Hu H, Wu J, Li-Chan ECY, Zhu L, Zhang F, Xu X, et al. Effects of ultrasound on structural and physical properties of soy protein isolate (SPI) dispersions. *Food Hydrocolloids*. 2013;30(2):647-55.
 ۲۰. Mozafarpour R, Koocheki A, Nicolai T. Modification of grass pea protein isolate (*Lathyrus sativus* L.) using high intensity ultrasound treatment: Structure and functional properties. *Food Research International*. 2022;158:111520.
 ۲۱. Higuera-Barraza OA, Del Toro-Sanchez CL, Ruiz-Cruz S, Márquez-Ríos E. Effects of high-energy ultrasound on the functional properties of proteins. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2016;31:558-62.
 ۲۲. Mastani S, Bahmanyar F, Shojae-Aliabadi S, Mirmoghtadaie L, Hosseini SM. Effect of dual physical modifications on structural and functional properties of gluten and whey protein: Ultrasound and microwave. *Food Science and Technology International*. 2023;10820132231182099.
 ۲۳. Nazari B, Mohammadifar MA, Shojae-Aliabadi S, Feizollahi E, Mirmoghtadaie L. Effect of ultrasound treatments on functional properties and structure of millet protein concentrate. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2018;41:382-8.
 ۲۴. Mir NA, Riar CS, Singh S. Physicochemical, molecular and thermal properties of high-intensity ultrasound (HIUS) treated protein isolates from album (*Chenopodium album*) seed. *Food Hydrocolloids*. 2019;96:433-41.
 ۲۵. Qin N, Nie J, Hou Y, Shuang Q, Bao X. Ultrasound-assisted macroporous resin treatment improves the color and functional properties of sunflower meal protein. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2024;102:106750.
 ۲۶. Cao J, Tong X, Wang M, Tian T, Yang S, Sun M, et al. Soy Protein Isolate/Sodium Alginate Microparticles under Different pH Conditions: Formation Mechanism and Physicochemical Properties. *Foods*. 2022;11(6):790.
 ۲۷. Gallagher W. FTIR analysis of protein structure. *Course manual Chem*. 2009;455.
 ۲۸. Kong J, Yu S. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta biochimica et biophysica Sinica*. 2007;39(8):5۰۹-۴۹.
 ۲۹. Guo C, Zhang Z, Chen J, Fu H, Subbiah J, Chen X, Wang Y. Effects of radio frequency heating treatment on structure changes of soy protein isolate for protein modification. *Food and Bioprocess Technology*. 2017;10:1574-83.
 ۳۰. Hu H, Cheung IW, Pan S, Li-Chan EC. Effect of high intensity ultrasound on physicochemical and functional properties of aggregated soybean β -conglycinin and glycinin. *Food Hydrocolloids*. 2015;45:102-10.

Investigating the Functional and Structural Properties of Modified Pea Protein Isolate Using High-Intensity Ultrasound

Bahmanyar F^{2,1}, Sohrabi S³, Pashaei M⁴, Mirmoghtadaie L⁵

- 1- Student Research Committee, Department of Food Science and Technology, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
- 2- Pistachio Safety Research Center, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran.
- 3- Department of Food Science and Technology, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
- 4- Department of Food Science and Technology, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
- 5- Corresponding author: Associate Prof., Department of Food Science and Technology, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. Email: Mirmoghtadaie@sbmu.ac.ir

Received 25 Oct, 2025

Accepted 8 Feb, 2026

Background and Objectives: Pea protein has attracted much attention as a plant protein source with low allergenicity, non-genetically modified, inexpensive, high nutritional value, and wide availability; however, it has limited functional properties. High-intensity ultrasound processing can improve functional and structural properties due to cavitation effects. The aim of this study was to investigate the effects of high-intensity ultrasound processing on the functional and structural properties of pea protein isolate.

Materials & Methods: Pea protein isolate dispersions (5% w/v) were modified by ultrasound at frequency of 20 Hz and powers of 100, 300, and 200 W for 10 minutes, and then their functional and structural properties were evaluated.

Results: High-intensity ultrasound significantly increased the emulsifying activity and emulsion stability of pea protein isolates ($P < 0.05$). Modification of pea protein isolate by ultrasound at 300 W for 10 min increased the protein solubility in the range of $6 > \text{pH} > 4$ compared to the unmodified sample; this sample also showed the highest L^* index and the lowest a^* and b^* ($P < 0.05$). In addition, Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) showed changes in secondary structure of modified pea protein isolate; and scanning electron microscope (SEM) images showed that the spherical shape of pea protein isolate after modification was transformed into heterogeneous sheet structures.

Conclusion: This study suggests that pea protein isolates can improve their functional and structural properties with high-intensity ultrasound at 300 W for 10 minutes.

Keywords: Pea protein isolate, High-intensity ultrasound, Functional and structural properties