

بهینه‌سازی ظرفیت امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون پروتئین هسته انگور به روش سطح پاسخ

محسن رمضانی^۱، نفیسه زمیندار^{۲*}

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

۲- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

چکیده

هسته انگور، محصول جانبی کارخانجات فرآوری انگور، حاوی مقدار قابل توجهی پروتئین طبیعی می‌باشد که می‌تواند به‌عنوان یک افزودنی در تولید محصولات غذایی استفاده شود. اطلاعات در مورد پروتئین هسته انگور، از جمله روش‌های استخراج و جداسازی و همچنین خواص عملکردی آن، محدود است. این پژوهش با هدف بهینه‌سازی فرایند استخراج برای دستیابی به حداکثر ظرفیت امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون پروتئین هسته انگور انجام شد. بدین منظور، تأثیر متغیرهای مستقل استخراج شامل زمان استخراج (۲ تا ۱۸ دقیقه) و دما (۲۰ تا ۴۰ درجه سانتی‌گراد) حمام فراصوت، pH (۹ تا ۱۱) و دمای سانتریفوژ (۴ تا ۲۰ درجه سانتی‌گراد) بر خواص عملکردی ظرفیت امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون پروتئین هسته انگور در ۳۹ اجرای مختلف با استفاده از روش سطح پاسخ بررسی شدند. حداکثر ظرفیت امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون در شرایط بهینه زمان ۱۷/۹ دقیقه و دمای ۳۶/۳ درجه سانتی‌گراد حمام فراصوت، pH برابر ۹ و دمای سانتریفوژ ۱۳/۷ درجه سانتی‌گراد به‌دست آمد. استخراج پروتئین مطابق شرایط بهینه در ۳ تکرار انجام شد و خواص عملکردی آن با داده‌های پیش‌بینی شده با آزمون t-student در سطح احتمال ۵ درصد مورد مقایسه قرار گرفتند و تفاوت معنی‌داری نشان ندادند. نتایج این پژوهش کارایی روش سطح پاسخ در بهینه‌سازی فرایند استخراج و قابلیت اطمینان مدل انتخابی در پیش‌بینی خواص عملکردی پروتئین هسته انگور را نشان می‌دهد. علاوه بر این، پروتئین هسته انگور در شرایط بهینه خواص امولسیونی قابل قبولی نشان داد. همچنین این نتایج به طراحی فرایند استخراج بهینه پروتئین از هسته‌های انگور برای استفاده‌های آتی در صنایع غذایی کمک می‌کند.

واژه‌های کلیدی: پروتئین هسته انگور، ظرفیت امولسیون‌کنندگی، پایداری امولسیون.

* مسئول مکاتبات: n.zamindar@khuisf.ac.ir

با توجه به رشد جمعیت جهانی، نیاز فزاینده‌ای به منابع پروتئینی پایدار و جایگزین برای تأمین نیازهای تغذیه‌ای توده مردم وجود دارد. صنایع، همراه با سایر جوامع تحقیقاتی، به‌طور فزاینده‌ای علاقه‌مند به بررسی منابع پروتئین گیاهی به‌جای پروتئین‌های حیوانی هستند که به دلایل مختلفی از جمله عرضه محدود، افزایش قیمت بازار، اثرات زیست‌محیطی، اعتقادات اخلاقی و مذهبی مصرف‌کنندگان و شیوع بیماری‌های حیوانی مانند آنفلوآنزای مرغی و آنفلوآنزای خوکی است (۱۳). علاوه بر این، شناسایی منابع پایدار پروتئین گیاهی که هنوز به‌طور کامل مورد بررسی قرار نگرفته‌اند، به‌منظور کاهش فشار اقتصادی برای تولید پروتئین‌های اصلی مانند سویا، نخود و سایر پروتئین‌ها و کاهش وابستگی به پروتئین‌های حیوانی از اهمیت بالایی برخوردار است (۲۲).

پروتئین‌های گیاهی حاصل از ضایعات و پسماندهای صنایع تبدیلی کشاورزی، راه‌حلی امیدوارکننده و پایدار برای پاسخگویی به تقاضای روزافزون پروتئین و همچنین کاهش ضایعات مواد غذایی و تأثیرگذاری بر محیط‌زیست ارائه می‌دهند. صنایع کشاورزی در مراحل مختلف فرآوری، مقادیر قابل توجهی ضایعات و فرآورده‌های جانبی تولید می‌کنند که اغلب کم استفاده هستند یا دور ریخته می‌شوند. با این حال، این باقی‌مانده‌ها می‌توانند منابع غنی از مواد مغذی و پروتئین‌های ارزشمندی باشند که می‌توان آن‌ها را استخراج کرد و به‌عنوان مواد تشکیل‌دهنده کاربردی در محصولات غذایی و مکمل‌های غذایی گنجانده (۹).

بر اساس آمار سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحد در سال ۲۰۲۱، سالانه ۷۹ میلیون تن انگور فراوری می‌شود که تقریباً ۷۵ درصد از مجموع جهانی آن را تشکیل می‌دهد (۷). هسته انگور محصول جانبی اصلی فرآوری انگور است که بیش از ۱۰ میلیون تن در سال می‌باشد و در بسیاری از کارخانه‌ها به‌عنوان ضایعات در نظر گرفته می‌شود. هسته انگور متشکل از ۴۰ درصد فیبر، ۱۶ درصد روغن، ۱۱ درصد پروتئین و سایر ترکیباتی مانند ترکیبات فنولی، قندها و مواد معدنی می‌باشد. پروتئین هسته انگور حاوی تمام اسیدهای آمینه ضروری، به‌ویژه والین، آرژنین، متیونین و فنیل‌آلانین است که اسیدهای آمینه محدودکننده در غذاهای اصلی به شمار می‌روند (۴).

کیفیت تغذیه‌ای پروتئین‌های موجود در هسته انگور برای مدت زمان طولانی موردتوجه قرار گرفته است، زیرا این پروتئین‌ها دارای ویژگی‌های تغذیه‌ای مشابه با غلات و سایر پروتئین‌های گیاهی هستند. علاوه بر این، پروتئین‌های هسته انگور برخی ویژگی‌های عملکردی مانند حلالیت خوب و فعالیت امولسیون‌کنندگی را نشان می‌دهد (۸). از آنجاکه ترکیب اسیدآمینه و خواص عملکردی پروتئین‌های موجود در هسته انگور بسیار شبیه به پروتئین‌های غلات و سایر پروتئین‌های گیاهی است، می‌توان از آن‌ها به‌عنوان جایگزین این مواد در غذاهایی که به‌عنوان افزودنی استفاده می‌شوند، بهره برد (۲۶).

امولسیون‌سازی مهم‌ترین فرآیند در تولید بسیاری از غذاهای فرموله شده است. خواص امولسیون‌ی پروتئین، توانایی پروتئین برای مشارکت در تشکیل امولسیون و تثبیت امولسیون تازه ایجادشده است. خواص امولسیون‌کنندگی و ویژگی عملکردی مفیدی است که نقش مهمی در توسعه منابع جدید محصولات پروتئین گیاهی برای استفاده به‌عنوان غذا ایفا می‌کند. در بیشتر امولسیون‌های غذایی، پروتئین‌ها اجزای غالب هستند و در ترکیب با لیپیدها و کربوهیدرات‌ها، تثبیت‌کننده‌های مهمی به شمار می‌روند (۲۴). مطالعات در مورد خواص عملکردی پروتئین هسته انگور محدود هستند. ظرفیت امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون پروتئین هسته انگور در پژوهش آلوارز-اساریو و همکاران (۲۰۲۲) و ژو و همکاران (۲۰۱۱) بررسی شده است (۲، ۲۷).

باوجود تولید انبوه هسته انگور به عنوان محصول جانبی فراوری انگور، استفاده تجاری از پروتئین استخراج شده از آن در صنایع غذایی محدود است. از آنجایی که بازده، ترکیب و خواص عملکردی پروتئین به شدت تحت تأثیر روش استخراج و کارایی آن و همچنین ترکیب و کیفیت پروتئین موجود در ماده اولیه قرار می گیرد (۲)، به همین دلیل در این پژوهش، با هدف توسعه منابع جدید پروتئینی در صنایع غذایی، به بررسی و بهینه سازی متغیرهای استخراج بر ظرفیت امولسیون کنندگی و پایداری امولسیون پروتئین هسته انگور پرداخته شده است.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- مواد اولیه

هسته انگور از فروشگاه اینترنتی گیاه کالا واقع در استان خراسان رضوی تهیه گردید. هسته ها بوجاری شده بوده و فاقد هرگونه ناخالصی بودند. روغن هسته های انگور با استفاده از دستگاه روغن گیر پرس سرد (CPS200، سپاهان کلد پرسینگ، ایران)، جدا شد. در ادامه کنجاله های به دست آمده توسط آسیاب برقی (STAR، RRH-500A، چین) به پودر تبدیل شدند. پودر کنجاله هسته انگور به مدت ۱ ساعت با حلال هگزان با نسبت ۱ به ۴ هم زده و باقی مانده روغن آن نیز گرفته شد. پودرها به مدت ۲۴ ساعت زیر هود قرار داده شده تا به طور کامل خشک شوند. در نهایت پودر چربی گیری شده هسته انگور تا زمان انجام آزمون ها در فریزر ۱۸- درجه سانتی گراد نگهداری شدند (۳).

۲-۲- استخراج پروتئین

۲-۲-۱- پیش تیمار فراصوت

جهت افزایش راندمان و سرعت استحصال پروتئین و تخریب بافت سلولزی نمونه تهیه شده از هسته انگور از امواج فراصوت کمک گرفته شد. در این روش از دستگاه حمام فراصوت (PARSONIC 15s، پارس نهند، حجم ۱۲ لیتر، ایران) استفاده شد. به این منظور ابتدا ۴۰ گرم پودر به ظرف مخصوص اعمال فراصوت منتقل و ۳ برابر وزنی به آن ها آب مقطر اضافه گردید (۱۲). سپس مخلوط ها بر اساس طرح آزمایش جدول ۱، طی زمان ها و دماهای تعیین شده در معرض امواج فراصوت قرار گرفتند. در طول مدت پیش فراوری امواج با فرکانس 5 ± 28 ٪ کیلوهرتز و توان حداکثر ۲۰۰ وات بر ظرف حاوی نمونه اعمال شد. پس از انجام پیش فراوری بلافاصله استخراج قلیایی انجام شد.

۲-۲-۲- استخراج قلیایی

برای استخراج قلیایی نمونه های پیش تیمار شده ابتدا pH مخلوط با استفاده از محلول ۰/۵ مولار سدیم هیدروکسید مطابق جدول ۱ به pH های تعیین شده رسانده شد. در مرحله بعد مخلوط به مدت ۲۰ دقیقه و در دمای تعیین شده در جدول ۱ با سرعت ۹۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ (PIT320R، پل ایده آل تجهیز، ایران) شد. سپس مایع رویی جمع آوری شد. در ادامه مقدار pH مایع رویی با اسید کلریدریک ۰/۵ مولار به نقطه ایزوالکتریک پروتئین هسته انگور ۳/۸ (۲۷) تنظیم شد. محلول مجدداً به مدت ۲۰ دقیقه در دما و

دور مشابه سانتریفوژ شد. رسوب حاصل جمع آوری و با سدیم هیدروکسید ۰/۵ مولار خنثی شدند (۱۶). رسوب‌ها با استفاده از فریزر ۱۸- درجه سانتی گراد و خشک کن انجمادی (FD-5005، دنا و کیوم، ایران)، خشک شدند.

۳-۲- اندازه‌گیری ظرفیت امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون

برای تهیه امولسیون، ۹ میلی‌لیتر محلول ۱ درصد وزنی-حجمی پروتئین به همراه ۱ میلی‌لیتر روغن آفتابگردان با استفاده از دستگاه هموژنایزر (CROWN، CT13308، چین) به مدت ۱ دقیقه با سرعت ۲۰۰۰۰ دور بر دقیقه همگن و ارتفاع آن ثبت شد (H_0). امولسیون‌ها بلافاصله بعد از هموژن شدن در 1100 g به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند و ارتفاع لایه امولسیون شده بعد از سانتریفوژ اندازه‌گیری شد (H_1). ظرفیت امولسیون‌کنندگی با استفاده از رابطه ۱ محاسبه گردید (۲۰).

$$\text{Emulsifying Capacity} = (H_1 / H_0) \times 100 \quad \text{رابطه ۱}$$

به منظور بررسی پایداری امولسیون، نمونه‌ها دقیقاً قبل از سانتریفوژ به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری (3430، بهداد، ایران) ۸۰ درجه سانتی گراد قرار گرفتند و ارتفاع آن‌ها اندازه گرفته شد (H_2). پایداری امولسیون با رابطه ۲ محاسبه شد (۲۰).

$$\text{Emulsion Stability} = (H_1 / H_2) \times 100 \quad \text{رابطه ۲}$$

۴-۲- تجزیه و تحلیل آماری

در این پژوهش تأثیر ۴ متغیر مستقل زمان و دمای حمام فراصوت، pH و دمای سانتریفوژ بر روی پاسخ‌های ظرفیت و پایداری امولسیون با استفاده از نرم‌افزار دیزاین اکسپرت ۱۳، روش سطح پاسخ و طرح مرکب مرکزی در ۳۹ اجرای مختلف و ۷ تکرار در نقطه مرکزی به منظور بهینه‌سازی شرایط پژوهش مورد بررسی قرار گرفتند. در ادامه، استخراج پروتئین مطابق شرایط بهینه در ۳ تکرار انجام شد و خواص عملکردی آن با داده‌های پیش‌بینی شده با آزمون t-student با نرم‌افزار اکسل در سطح احتمال ۵ درصد مورد مقایسه قرار گرفتند.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- بررسی متغیرهای استخراج بر بهینه‌سازی خواص عملکردی پروتئین هسته انگور

جدول ۱ مقادیر متغیرهای مستقل مورد استفاده برای طراحی آزمایش و مقادیر وابسته به دست آمده برای هر تیمار را نشان می‌دهد.

جدول ۱ مقادیر متغیرهای مستقل و وابسته برای هر تیمار

تیمار	دما حمام فراصوت	زمان حمام فراصوت	pH	دما سانتریفوژ	ظرفیت امولسیون‌کنندگی	پایداری امولسیون
	(°C)	(دقیقه)		(°C)	(%)	(%)
۱	۲	۴۰	۱۰	۲۰	۲۲/۶۳	۹/۰۹
۲	۲	۲۰	۹	۲۰	۱۴/۹۵	۸/۱۸

12/31	17/6	20	9	40	2	3
12/78	23/02	12	10	30	2	4
10/71	16/58	12	10	20	10	5
11/72	17/61	12	10	20	10	6
13/25	20/86	12	10	30	10	7
11/59	17/66	12	10	40	10	8
11/77	22/31	4	10	30	10	9
11/09	22/79	4	9	20	18	10
12/24	23/16	12	10	30	18	11
11/06	23/29	4	11	40	2	12
11/43	22/15	4	9	20	2	13
11/56	24/46	12	11	30	10	14
12/1	22/15	12	10	30	10	15
8/52	20/24	20	11	20	2	16
9/07	19/92	4	11	40	18	17
8/76	22/35	20	11	40	18	18
14/7	23/9	12	9	30	10	19
11/67	21/67	12	10	30	2	20
10/41	21/59	20	9	20	18	21
14/59	23/69	4	9	40	2	22
10/53	20/71	20	10	30	10	23
11/52	22	20	10	30	10	24
12/25	20/68	12	10	30	10	25
13/16	21/23	12	10	30	10	26
13/39	24/59	12	10	30	18	27
12/13	22/63	12	10	30	10	28
14/89	23/34	20	9	40	18	29
12/88	23/69	4	10	30	10	30
12/41	21/37	4	11	20	18	31
12/65	23/03	12	11	30	10	32
13/22	23/22	12	10	30	10	33
12/35	25/34	4	9	40	18	34
13/43	22/51	12	9	30	10	35
12/68	18/75	12	10	40	10	36
13/19	22/07	12	10	30	10	37

۳۸	۲	۲۰	۱۱	۴	۲۴/۳۱	۱۱/۵۲
۳۹	۱۸	۲۰	۱۱	۲۰	۲۴/۴۶	۹/۸۸

جدول ۲، آنالیز واریانس مقادیر به دست آمده برای ظرفیت امولسیون کنندگی و پایداری امولسیون پروتئین هسته انگور را نشان می دهد.

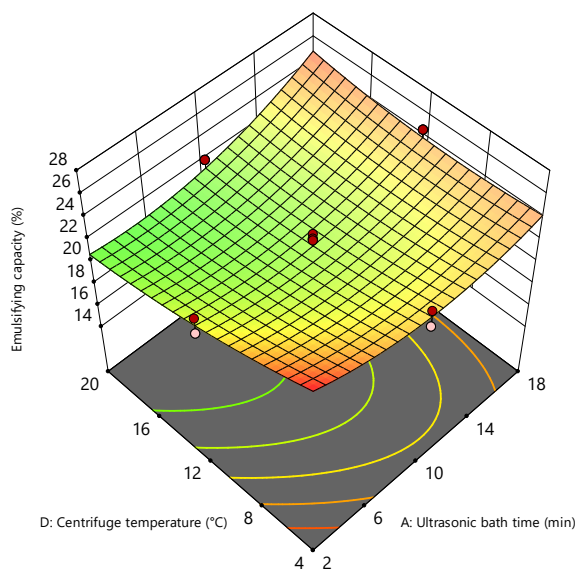
جدول ۲ آنالیز واریانس مقادیر به دست آمده برای ظرفیت امولسیون کنندگی و پایداری امولسیون هسته انگور

منبع	درجه آزادی	ظرفیت امولسیون کنندگی		پایداری امولسیون	
		مجموع مربعات	ضریب رگرسیون	مجموع مربعات	ضریب رگرسیون
مدل درجه دوم	۱۴	۱۹۶/۰۶	۱۶۴/۴۷***	۹۱/۶۵	۱۴/۵۸۰۳۱***
A – زمان حمام فراصوت	۱	۱۱/۸۰	۰/۸۱۰۰۲۸**	۰/۵۵۷۱	۰/۲۸۰۲۵ ^{ns}
B – دما حمام فراصوت	۱	۳/۶۳	۳/۰۵۰۷۵*	۵/۵۳	۱/۷۱۵۹۵**
pH – C	۱	۳/۳۶	-۳۶/۶۵۳۴۴*	۱۷/۷۹	-۱/۳۴۴۶۰***
D – دما سانتیفریژ	۱	۱۸/۰۳	-۱/۹۷۹۵۵***	۹/۹۱	۰/۳۴۲۸۰۹***
AB	۱	۱/۴۵	-۰/۰۰۳۷۶۶ ^{ns}	۲/۳۴	-۰/۰۰۴۷۸۰*
AC	۱	۱۸/۱۵	-۰/۱۳۳۱۲۵***	۰/۳۳۰۱	-۰/۰۱۷۹۵۳ ^{ns}
AD	۱	۲۵/۸۶	۰/۰۱۹۸۶۳***	۵/۶۶	۰/۰۰۹۲۹۵**
BC	۱	۷/۱۳	-۰/۰۶۶۷۵۰**	۱۸/۸۷	-۰/۱۰۸۶۱۳***
BD	۱	۰/۵۸۵۲	۰/۰۰۲۳۹۱ ^{ns}	۳/۴۶	۰/۰۰۵۸۱۱**
CD	۱	۱۸/۶۶	۰/۱۳۵۰۰۰***	۱/۰۷	-۰/۰۳۲۳۵۹ ^{ns}
A ²	۱	۱۲/۵۹	۰/۰۲۴۵۹۲**	۰/۱۱۹۹	-۰/۰۰۲۴۰۰ ^{ns}
B ²	۱	۷۶/۷۵	-۰/۰۳۸۸۶۱***	۵/۰۷	-۰/۰۰۹۹۸۶**
C ²	۱	۱۹/۱۰	۱/۹۳۸۸۶***	۰/۸۶۰۱	۰/۴۱۱۳۸۶ ^{ns}
D ²	۱	۲/۰۹	۰/۰۱۰۰۲۱ ^{ns}	۵/۰۷	-۰/۰۱۵۶۰۳**
باقی مانده	۲۴	۱۵/۱۶		۱۰/۱۰	
عدم برازش	۱۰	۴/۸۸	ns	۳/۳۳	ns
خطا محض	۱۴	۱۰/۲۸		۶/۷۸	
کل	۳۸	۲۱۱/۲۲		۱۰۱/۷۵	
R ²			۰/۹۲۸۲		۰/۹۰۰۷
R ² adj			۰/۸۸۶۴		۰/۸۴۲۸
R ² pre			۰/۷۵۵۱		۰/۶۴۹۰
Adequate Precision			۲۰/۱۱۱۱		۱۵/۰۸۲۳
% C.V.			۳/۶۶		۵/۴۹

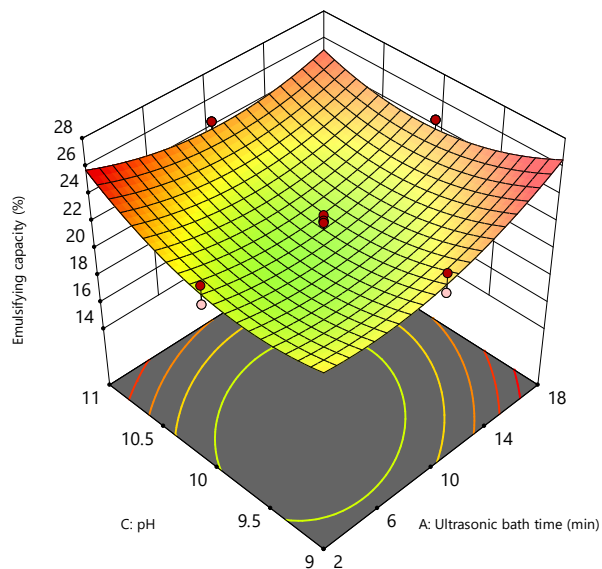
(***: $p < ۰/۰۰۰۱$), (**: $p < ۰/۰۱$), (*: $p < ۰/۰۵$), (^{ns}: عدم معنی داری در سطح احتمال ۵ درصد)

۳-۲- ارزیابی نتایج ظرفیت امولسیون کنندگی

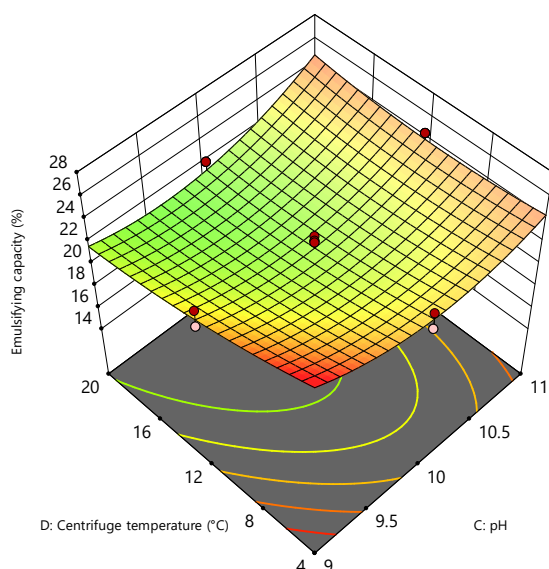
نتایج آنالیز واریانس تأثیر متغیرهای وابسته بر ظرفیت امولسیون کنندگی پروتئین‌های استخراج شده از هسته انگور در جدول ۲ نشان داده شده است. مطابق جدول ۲، مقدار p-value برای مدل درجه دوم با ضریب تبیین (R^2) ۰/۹۲۸۲ کمتر از ۰/۰۰۰۱ می‌باشد که نشان می‌دهد مدل بسیار معنی‌دار است. مقدار p-value برای عدم برازش این مدل برابر ۰/۷۳۹۸ بوده که بیانگر آن است که عدم برازش آن نیز معنی‌دار نیست و مدل داده‌ها را برازش می‌کند. ضریب تبیین تعدیل شده (R^2_{adj}) و پیش‌بینی شده (R^2_{pre}) به ترتیب برابر ۰/۸۸۶۴ و ۰/۷۵۵۱ می‌باشند. هرچقدر ضرایب تبیین به ۱ نزدیک‌تر باشند نشان‌دهنده دقت بیشتر مدل است و هرچه ضریب تبیین تعدیل شده و پیش‌بینی شده به هم نزدیک‌تر باشند، نشان‌دهنده توانایی بالای مدل در تعمیم‌پذیری و پیش‌بینی داده‌های جدید است. مقدار Adequate Precision بسیار بالاتر از مقدار مطلوب و برابر با ۲۰/۱۱۱۱ می‌باشد. این پارامتر بیانگر کارایی مدل برای پیش‌بینی پاسخ است. ضریب تغییرات (C.V. %) نیز در مقدار کم ۳/۶۶ درصد می‌باشد که نشان‌دهنده پراکندگی کم و همگنی بیشتر داده‌ها است (۱). مطابق جدول ۲، اثر تک عاملی همه‌ی متغیرهای مستقل معنی‌دار هستند ($p < ۰/۰۵$). اثرات متقابل دما × زمان حمام فراصوت و دمای حمام فراصوت × دمای سانتریفوژ معنی‌دار نشدند ($p > ۰/۰۵$). اثر درجه دوم دمای سانتریفوژ هم معنی‌دار نشد ($p > ۰/۰۵$). اثرات متقابل متغیرهای مستقل بر ظرفیت امولسیون کنندگی پروتئین استخراج شده از هسته انگور به ترتیب در شکل ۱ نشان داده شده‌اند.



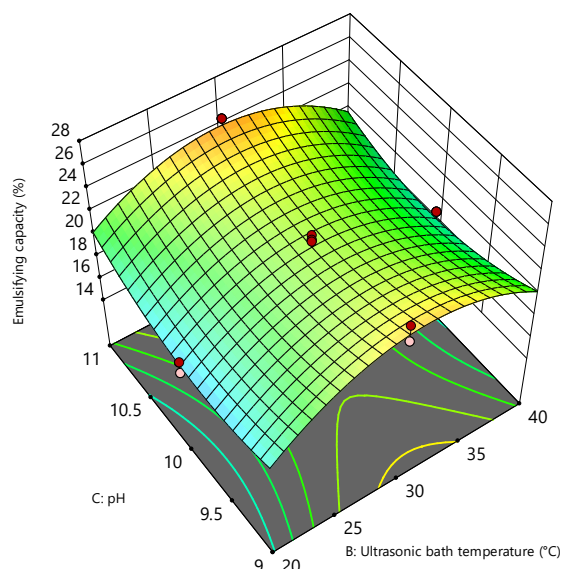
(ب)



(الف)



(د)



(ج)

شکل ۱- تأثیر شرایط استخراج (الف) زمان حمام فراصوت $\times$ pH، (ب) زمان حمام فراصوت $\times$ دمای سانتریفوژ، (ج) دمای حمام فراصوت $\times$ pH و (د) دمای سانتریفوژ بر ظرفیت امولسیون‌کنندگی پروتئین هسته انگور

شکل ۱-الف اثر متقابل زمان حمام فراصوت $\times$ pH بر ظرفیت امولسیون‌کنندگی پروتئین استخراج‌شده از هسته انگور را نشان می‌دهد. مطابق شکل افزایش متقابل زمان حمام فراصوت $\times$ pH ابتدا باعث کاهش و سپس افزایش معنی‌دار ظرفیت امولسیون‌کنندگی می‌شود. از کمترین زمان حمام فراصوت و کمترین مقدار pH (نقطه شروع شکل) به هر سمت که حرکت کنیم، درصد فعالیت امولسیون‌کنندگی افزایش معنی‌دار می‌یابد به‌طوری‌که بیشترین مقدار فعالیت امولسیون‌کنندگی در pH برابر ۹ و زمان حمام فراصوت ۱۸ دقیقه به‌دست آمده است.

شکل ۱-ب اثر متقابل زمان حمام فراصوت $\times$ دمای سانتریفوژ بر ظرفیت امولسیون‌کنندگی پروتئین استخراج‌شده از هسته انگور را نشان می‌دهد. مطابق شکل بیشترین ظرفیت امولسیون‌کنندگی در کمترین زمان حمام فراصوت $\times$ دمای سانتریفوژ به‌دست آمده است. با افزایش همزمان زمان حمام فراصوت $\times$ دمای سانتریفوژ، ظرفیت امولسیون‌کنندگی ابتدا کاهش و سپس افزایش می‌یابد. در زمان‌های پایین حمام فراصوت با افزایش دمای سانتریفوژ، ظرفیت امولسیون‌کنندگی کاهش معنی‌داری می‌یابد.

با توجه به شکل ۱-الف و ۱-ب و موارد گفته‌شده واضح است که افزایش زمان حمام فراصوت خصوصاً از زمان ۱۰ دقیقه به بعد، باعث افزایش ظرفیت امولسیون‌کنندگی شده است. مطالعات متعددی نتایج مشابهی را گزارش کرده‌اند. چندین دلیل می‌تواند این پدیده را بر اساس نتایج منتشرشده توضیح دهند. اولاً، افزایش حلالیت پروتئین پس از تیمار فراصوت، انتقال، جذب و سازمان‌دهی مجدد مولکول‌های پروتئین در سطح مشترک روغن-آب را تسهیل می‌کند (۱۱) و یک لایه امولسیون پایدارتر ایجاد می‌کند. ثانیاً، تخریب ساختار و توده‌های پروتئین توسط تیمار فراصوت منجر به آبرگریزی قوی‌تر و ترکیب پروتئینی انعطاف‌پذیرتر می‌شود (۲۳) که به‌طور بالقوه کشش سطحی را کاهش می‌دهد و منجر به اندازه کوچک‌تر و افزایش خواص امولسیون‌کنندگی می‌شود (۱۵).

شکل ۱-ج اثر متقابل دمای حمام فراصوت $\times$ pH بر ظرفیت امولسیون کنندگی پروتئین استخراج شده از هسته انگور را نشان می دهد. در شکل بیشترین ظرفیت امولسیون کنندگی در دمای میانه حمام فراصوت و pH ماکزیمم به دست آمده است. افزایش دمای حمام فراصوت در هر pH باعث افزایش و سپس کاهش ظرفیت امولسیون کنندگی شده است و بالعکس؛ افزایش pH در هر دمای حمام فراصوت باعث کاهش و سپس افزایش ظرفیت امولسیون کنندگی شده است.

شکل ۱-د اثر متقابل pH $\times$ دمای سانتریفوژ بر ظرفیت امولسیون کنندگی پروتئین استخراج شده از هسته انگور را نشان می دهد. همانند شکل ۱-ب (اثر متقابل زمان حمام فراصوت $\times$ دمای سانتریفوژ) بیشترین ظرفیت امولسیون کنندگی در کمترین pH و دمای سانتریفوژ به دست آمده است. افزایش دمای سانتریفوژ در pH های پایین باعث کاهش معنی دار ظرفیت امولسیون کنندگی شده است. افزایش همزمان هر دو متغیر pH و دمای سانتریفوژ ابتدا باعث کاهش و سپس افزایش ظرفیت امولسیون کنندگی شده است.

مطابق نتایج شکل ۱-ب و ۱-د، افزایش دمای سانتریفوژ باعث کاهش ظرفیت امولسیون کنندگی پروتئین هسته انگور شد. در شکل ۱-ج با افزایش دمای حمام فراصوت از ۲۰ تا ۳۰ درجه سانتی گراد ظرفیت امولسیون کنندگی به طور معنی داری افزایش یافت و از دمای ۳۰ تا ۴۰ درجه سانتی گراد، ظرفیت امولسیون کنندگی بشدت کاهش یافت. طبق گفته مک کلمنتس (۲۰۰۴)، زمانی که دما از مقدار بحرانی فراتر می رود، پروتئین باز می شود و گروه های آمینو غیرقطبی داخلی در معرض قرار می گیرند و باعث نامحلول شدن آن می شود یا برهمکنش های پروتئین-پروتئین را تقویت می کند. دنا تورا سیون حرارتی همچنین گروه های تیول واکنش گر را ایجاد می کند که برهمکنش های پروتئین را تقویت کرده و منجر به تغییرات در لخته سازی و ادغام قطرات می شود (۱۷). نتایج ما تأیید کرد که ظرفیت امولسیون کنندگی با افزایش دما کاهش می یابد و کاهش های مشاهده شده ممکن است با دنا تورا سیون و اندازه قطرات مرتبط باشد. افزایش ظرفیت امولسیون کنندگی با افزایش دما از ۲۰ تا ۳۰ درجه سانتی گراد با نتایج دیک و جانسون (۲۰۰۷) شباهت داشت. مطابق نتایج آن ها پروتئین های استخراج شده در دمای ۲۵ و ۴۰ درجه سانتی گراد بالاترین ظرفیت امولسیون کنندگی را داشتند. آن ها نتیجه گرفتند که ظرفیت امولسیون کنندگی تحت تأثیر مقدار بتا-کونگلیسینین موجود در پروتئین و حلالیت پروتئین بود. محتوای بالاتر بتا-کونگلیسینین و حلالیت بالاتر پروتئین، ظرفیت امولسیون کنندگی بالاتری را به همراه داشت (۶).

مطابق شکل ۱-الف، ۱-ج و ۱-د، با افزایش pH از ۹ تا ۱۰، ظرفیت امولسیون کنندگی کاهش یافته است در ادامه با افزایش pH از ۱۰ تا ۱۱، ظرفیت امولسیون کنندگی افزایش یافت. اوستبرینگ و همکاران (۲۰۲۰) گزارش کرده اند که pH استخراج بر ظرفیت امولسیون کنندگی پروتئین تأثیر گذار است. مطابق نتایج آن ها pH استخراج قلیایی ملایم تر با توانایی امولسیون کنندگی بالاتر همراه بود همچنین پروتئین های استخراج شده در $pH = 9$ قطرات امولسیون بسیار کوچک تری را نسبت به پروتئین های استخراج شده در pH های بالاتر تثبیت کردند (۱۹). داس و همکاران (۲۰۲۱) گزارش کرده اند که افزایش pH به سمت قلیایی شدید منجر به تبدیل ساختار پروتئین به شکل گسترده تر و انعطاف پذیری بیشتر در زنجیره پپتیدی و تجمع کمتر پروتئین در سطح مشترک روغن-آب می شود و در نتیجه ظرفیت امولسیون کنندگی پروتئین را به شدت افزایش می دهد. همچنین pH بسیار قلیایی، باعث افزایش حلالیت پروتئین و در معرض قرار گرفتن گروه های عاملی لیوفیل می شود که ظرفیت امولسیون کنندگی بهتری را فراهم می کند (۵). این عامل ممکن است مسئول بهبود ظرفیت امولسیون کنندگی پروتئین هسته انگور باشد.

با توجه به موارد گفته شده و ضرایب رگرسیون جدول ۲، مناسب ترین مدل برای پیش بینی ظرفیت امولسیون کنندگی پروتئین هسته انگور مطابق رابطه ۳ به دست می آید.

$$Y = 164.47 + (0.810028 \times A) + (3.05075 \times B) - (36.6534 \times C) - (1.97955 \times D) - (0.133125 \times A \times C) + (0.0198633 \times A \times D) - (0.06675 \times B \times C) + (0.135 \times C \times D) + (0.0245916 \times A^2) - (0.0388614 \times B^2) + (1.93886 \times C^2) \quad \text{رابطه ۳}$$

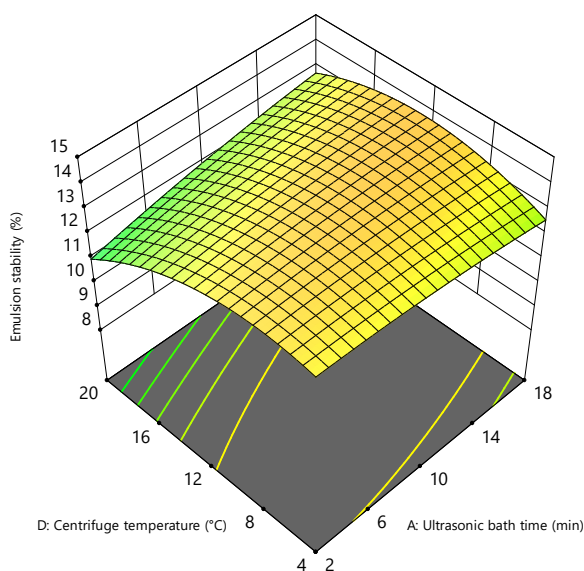
در این رابطه Y ظرفیت امولسیون کنندگی (%/.)، A و B به ترتیب دما ($^{\circ}\text{C}$) و زمان (دقیقه) حمام فراصوت، C برابر pH و D دمای سانتریفوژ ($^{\circ}\text{C}$) می باشند.

۳-۳- ارزیابی نتایج پایداری امولسیون

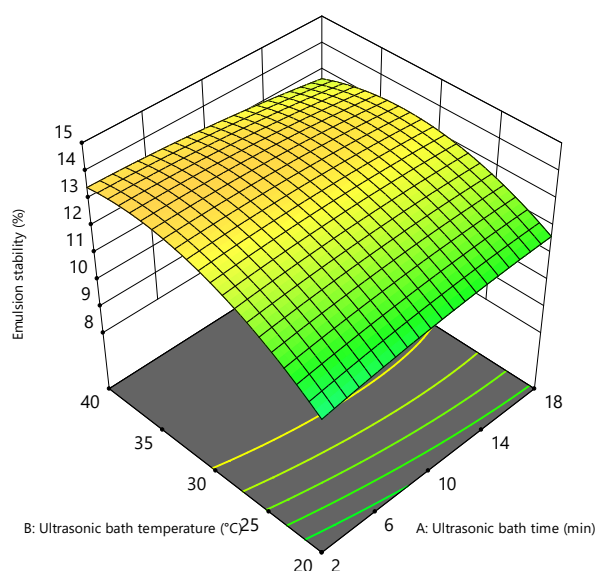
نتایج مربوط به آنالیز واریانس اثر متغیرهای وابسته بر پایداری امولسیون پروتئین استخراج شده از هسته انگور در جدول ۲ آورده شده است. مطابق جدول ۲، مدل درجه دوم با ضریب تبیین 0.907 بسیار معنی دار است ($p < 0.0001$) و عدم برازش آن معنی دار نیست ($p > 0.05$). فاصله بین ضریب تبیین تعدیل شده (0.8428) و پیش بینی شده (0.6490) حدود 20 درصد است. مقدار Adequate precision و ضریب تغییرات هر دو بسیار مطلوب و به ترتیب برابر با 15.0823 و 5.49 درصد می باشند.

با توجه به جدول ۲، اثر تک عاملی متغیر مستقل زمان حمام فراصوت معنی دار نشد ($p > 0.05$). اثرات متقابل زمان حمام فراصوت $\times$ pH و $\text{pH} \times$ دمای سانتریفوژ هم معنی دار نشدند ($p > 0.05$). اثرات درجه دوم زمان حمام فراصوت و pH نیز معنی دار نشدند ($p > 0.05$).

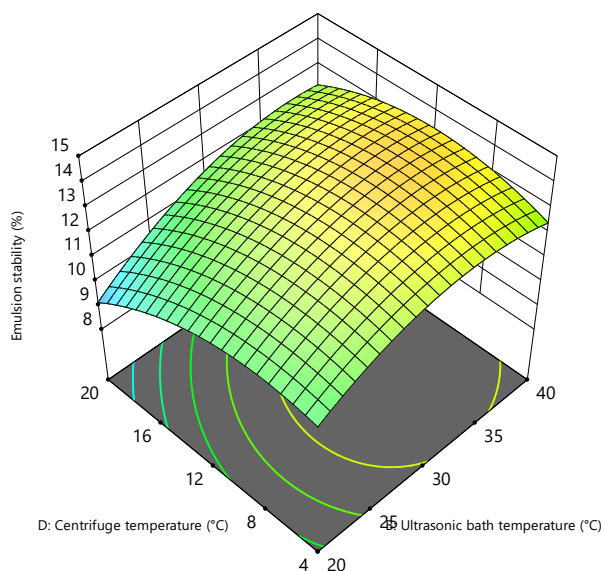
اثرات متقابل متغیرهای مستقل بر پایداری امولسیون پروتئین استخراج شده از هسته انگور به ترتیب در شکل ۲ نشان داده شده است.



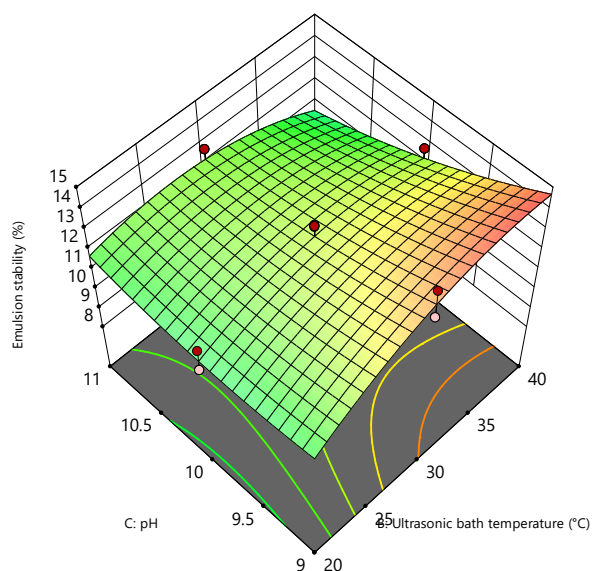
(ب)



(الف)



(د)



(ج)

شکل ۲- تأثیر شرایط استخراج (الف) زمان حمام فراصوت $\times$ دمای حمام فراصوت، (ب) زمان حمام فراصوت $\times$ دمای سانتریفوژ، (ج) دمای حمام فراصوت $\times$ pH و (د) دمای حمام فراصوت $\times$ دمای سانتریفوژ بر پایداری امولسیون پروتئین هسته انگور

شکل ۲-الف اثر متقابل زمان حمام فراصوت $\times$ دمای حمام فراصوت بر پایداری امولسیون پروتئین استخراج شده از هسته انگور را نشان می‌دهد. با توجه به شیب زیاد شکل و جهت آن، مشخص است که افزایش دمای حمام فراصوت باعث افزایش معنی‌دار پایداری امولسیون شده است و اثر آن بیشتر از زمان حمام فراصوت است.

شکل ۲-ب اثر متقابل زمان حمام فراصوت $\times$ دمای سانتریفوژ بر پایداری امولسیون پروتئین استخراج شده از هسته انگور را نشان می‌دهد. مطابق شکل بیشترین پایداری در طولانی‌ترین زمان حمام فراصوت و دمای میانه‌ی سانتریفوژ به دست آمده است. افزایش دمای سانتریفوژ در هر زمان حمام فراصوت، باعث افزایش معنی‌دار و سپس کاهش معنی‌دار پایداری امولسیون شده است.

با توجه به شکل ۲-الف و ۲-ب، افزایش زمان حمام فراصوت در شرایط مناسب تا حدودی باعث افزایش پایداری امولسیون شده است. مطالعات مختلف گزارش کرده‌اند که پیش‌تیمار فراصوت اندازه توده‌های پروتئین را کاهش و فعالیت سطحی را افزایش می‌دهد در نتیجه قطرات امولسیون پروتئین کوچک‌تر و پایدارتر می‌شوند (۱۸). ژائو و همکاران (۲۰۲۱) با بررسی اثر پیش‌تیمار فراصوت بر استخراج قلیایی پروتئین نتیجه گرفتند که پایداری امولسیون مشاهده شده ممکن است به قطرات امولسیون کوچک‌تر نسبت داده شود (۲۵).

شکل ۲-ج اثر متقابل زمان حمام فراصوت $\times$ pH را بر پایداری امولسیون پروتئین استخراج شده از هسته انگور نشان می‌دهد. مطابق شکل بیشترین پایداری در pH برابر ۹ و دماهای بالای حمام فراصوت به دست آمده است. افزایش pH خصوصاً در دماهای بالا باعث کاهش معنی‌دار پایداری امولسیون شده است.

در پژوهشی توسط هو و همکاران (۲۰۱۷) با افزایش غلظت قلیایی پایداری امولسیون پروتئین روند نزولی نشان داد که ممکن است مربوط به تولید پروتئین با وزن مولکولی پایین به دلیل تخریب مولکول‌های پروتئین باشد (۱۰). در پژوهش پارامان و همکاران (۲۰۰۸) هم با افزایش pH استخراج از ۹ تا ۱۲، پایداری امولسیون به طور معنی داری کاهش یافت. آن‌ها نتیجه گرفتند کاهش مشاهده شده می تواند به دلیل خلوص پروتئین، ترکیب، آبریزی سطح و حلالیت پروتئین باشد (۲۱).

شکل ۲-د اثر متقابل دمای حمام فراصوت × دمای سانتریفوژ بر پایداری امولسیون پروتئین استخراج شده از هسته انگور را نشان می دهد. مطابق شکل بیشترین پایداری در دماهای بالای حمام فراصوت و دمای میانه سانتریفوژ به دست آمده است. افزایش دمای حمام فراصوت در هر دمای سانتریفوژ باعث افزایش پایداری شده است درحالی که افزایش دمای سانتریفوژ ابتدا باعث افزایش و سپس کاهش پایداری امولسیون شده است.

مطابق شکل ۲-ب و ۲-د، افزایش دمای سانتریفوژ منجر به کاهش پایداری امولسیون شده است درحالی که در شکل ۲-ج و ۲-د، افزایش دمای حمام فراصوت منجر به افزایش معنی دار پایداری امولسیون شده است. لی و همکاران (۲۰۱۹) گزارش کرده اند دمای گرمایش بالاتر با پایداری فیزیکی امولسیون همبستگی مثبت دارد. آن‌ها نتیجه گرفتند که عملیات حرارتی پروتئین، مقدار مطلق پتانسیل زتا امولسیون را کاهش می دهد اما پایداری آن را از طریق کاهش اندازه ذرات روغن و افزایش درصد پروتئین جذب شده در لایه سطحی بهبود می بخشد (۱۴).

با توجه به موارد عنوان شده و همچنین ضرایب رگرسیون جدول ۲، مدل مناسب برای پیش بینی پایداری امولسیون پروتئین هسته انگور مطابق رابطه ۴ به دست می آید.

$$Y = 14.5803 + (1.71595 \times B) - (5.3446 \times C) + (0.342809 \times D) - (0.00477969 \times A \times B) + (0.00929492 \times A \times D) - (0.108613 \times B \times C) + (0.00581094 \times B \times D) - (0.00998614 \times B^2) - (0.0156033 \times D^2) \quad \text{رابطه ۴}$$

در این رابطه Y پایداری امولسیون (/)، A و B به ترتیب دما ($^{\circ}\text{C}$) و زمان (دقیقه) حمام فراصوت، C برابر pH و D دمای سانتریفوژ ($^{\circ}\text{C}$) می باشند.

۳-۴- بهینه سازی متغیرهای استخراج برای ظرفیت امولسیون کنندگی و پایداری امولسیون پروتئین هسته انگور

پس از آنالیز واریانس داده ها، به منظور دستیابی به حداکثر ظرفیت امولسیون کنندگی و پایداری امولسیون، تمامی متغیرهای مستقل بهینه سازی عددی شدند. داده های پیش بینی شده برای نمونه بهینه مطابق جدول ۳ در شرایط زمان ۱۷/۹ دقیقه و دمای ۳۶/۳ درجه سانتی گراد حمام فراصوت، pH برابر ۹ و دمای سانتریفوژ ۱۳/۷ درجه سانتی گراد به دست آمد. جهت بررسی صحت فرایند بهینه سازی، استخراج پروتئین مطابق شرایط پیشنهادی نرم افزار در ۳ تکرار انجام و خواص عملکردی آن اندازه گیری شد. داده های به دست آمده آزمایشگاهی با داده های پیش بینی شده به وسیله آزمون t_student در جدول ۴ مورد مقایسه قرار گرفتند. نتایج نشان داد این داده ها تفاوت معنی داری ندارند که بیانگر دقت مناسب آزمون می باشد.

جدول ۳ شرایط پیشنهادی نرم افزار برای بهینه سازی

شماره	زمان حمام	دمای حمام	pH	دمای	ظرفیت	پایداری	مطلوبیت
	فراصوت	فراصوت	سانتریفوژ	امولسیون کنندگی	امولسیون		
	(دقیقه)	(°C)	(°C)	(%)	(%)		
۱	۱۷/۹۵۸	۳۶/۳۲۷	۹/۰۰۰	۱۳/۷۴۲	۲۵/۳۴۰	۱۴/۶۴۴	۰/۹۸۱

جدول ۴ مقایسه داده های پیش بینی شده با داده های آزمایشگاهی

پیش بینی شده	آزمایشگاهی			Mean $\pm$ SD
	تکرار ۱	تکرار ۲	تکرار ۳	
ظرفیت امولسیون کنندگی	۲۵/۳۴۰ ^a	۲۴/۲۳	۲۵/۲۵۳	۲۴/۶۵ $\pm$ ۰/۵۳ ^a
پایداری امولسیون	۱۴/۶۴۴ ^a	۱۳/۳۳۲	۱۴/۳۹۲	۱۴/۴۹ $\pm$ ۱/۲ ^a

اعداد با حروف مشترک در هر ردیف دارای تفاوت معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد نمی باشند

۴- نتیجه گیری

در این پژوهش، بهینه سازی شرایط استخراج پروتئین هسته انگور با استفاده از روش سطح پاسخ برای دستیابی به حداکثر میزان ظرفیت و پایداری امولسیون مورد بررسی قرار گرفت و متغیرهای دما و زمان پیش تیمار حمام فراصوت، pH و دمای سانتریفوژ به عنوان متغیرهای مستقل استخراج انتخاب شدند. نتایج آنالیز واریانس حاصل از اعمال مدل آماری درجه دوم بر روی داده های تجربی نشان داد که این مدل قادر به پیش بینی دقیق پارامترهای پاسخ با دقت بالایی می باشد. نتایج بررسی خواص عملکردی پروتئین هسته انگور نشان داد که ظرفیت و پایداری امولسیون پروتئین تحت تأثیر متغیرهای استخراج هستند به طوری که با افزایش زمان و دمای حمام فراصوت، ظرفیت و پایداری امولسیون افزایش یافت. با این حال، افزایش بیش از ۳۰ درجه حمام فراصوت باعث کاهش ظرفیت امولسیون کنندگی شد. افزایش دمای سانتریفوژ و افزایش pH هم منجر به کاهش ظرفیت و پایداری امولسیون شدند ولی افزایش pH بیشتر از ۱۰ باعث افزایش ظرفیت امولسیون کنندگی شد. علاوه بر این، تفاوت معنی داری بین داده های پیش بینی شده و داده های تجربی مشاهده نشد که نشان دهنده تطابق بسیار خوب مدل با داده های آزمایشگاهی است. در مجموع، پروتئین هسته انگور تحت شرایط بهینه استخراج، خواص امولسیونی قابل قبولی را نشان داد که ضرورت انجام مطالعات بیشتر برای توسعه و کاربرد آن به عنوان یک منبع پروتئینی جدید در صنایع غذایی را نشان می دهد. همچنین، نتایج این مطالعه می تواند به عنوان پایه ای برای مطالعات آینده در زمینه بهینه سازی فرآیند استخراج و کاربردهای جدید پروتئین هسته انگور در صنایع غذایی باشد.

۱. کاشانی نژاد، م. ۱۳۹۵. طراحی و تحلیل آزمایش‌ها در صنایع غذایی با نرم‌افزار *Design Expert 9*. جلد اول، انتشارات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ۳۸۴ صفحه. شابک: ۹۷۸-۹۶۴-۸۹۲۶-۸۷-۳.
2. Alvarez-Ossorio C, Orive M, Sanmartín E, Alvarez-Sabatel S, Labidi J, Zufia J, Bald C. Composition and techno-functional properties of grape seed flour protein extracts. *ACS Food Science & Technology*. 2022 Jan 11;2(1):125-35. Doi: 10.1021/acsfoodscitech.1c00367
3. Baca-Bocanegra B, Nogales-Bueno J, Hernández-Hierro JM, Heredia FJ. Optimization of protein extraction of oenological interest from grape seed meal using design of experiments and response surface methodology. *Foods*. 2021 Jan 4;10(1):79. Doi: 10.3390/foods10010079
4. Costa GN, Tonon RV, Mellinger-Silva C, Galdeano MC, Iacomini M, Santiago MC, Almeida EL, Freitas SP. Grape seed pomace as a valuable source of antioxidant fibers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2019 Aug 15;99(10):4593-601. Doi: 10.1002/jsfa.9698
5. Das D, Mir NA, Chandla NK, Singh S. Combined effect of pH treatment and the extraction pH on the physicochemical, functional and rheological characteristics of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed protein isolates. *Food Chemistry*. 2021 Aug 15;353:129466. Doi: 10.1016/j.foodchem.2021.129466
6. Deak NA, Johnson LA. Effects of extraction temperature and preservation method on functionality of soy protein. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2007 Mar;84(3):259. Doi: 10.1007/s11746-007-1035-7
7. FAOSTAT. FAOSTAT Crops Statistics; 2021. Available at: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> Cited January 20, 2021.
8. Gazzola D, Vincenzi S, Gastaldon L, Tolin S, Pasini G, Curioni A. The proteins of the grape (*Vitis vinifera* L.) seed endosperm: Fractionation and identification of the major components. *Food Chemistry*. 2014 Jul 15;155:132-9. Doi: 10.1016/j.foodchem.2014.01.032
9. Hadidi M, Aghababaei F, Gonzalez-Serrano DJ, Goksen G, Trif M, McClements DJ, Moreno A. Plant-based proteins from agro-industrial waste and by-products: Towards a more circular economy. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2024 Jan 20:129576. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2024.129576
10. Hou F, Ding W, Qu W, Oladejo AO, Xiong F, Zhang W, He R, Ma H. Alkali solution extraction of rice residue protein isolates: Influence of alkali concentration on protein functional, structural properties and lysinoalanine formation. *Food Chemistry*. 2017 Mar 1;218:207-15. Doi: 10.1016/j.foodchem.2016.09.064
11. 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 Mar 1;45:102-10. Doi: 10.1016/j.foodhyd.2014.11.004
12. Karami Z, Mirzaei H, Emam-Jom'e Z, Khamiri M. Investigation and comparison of ultrasonic assisted extraction of phenolic compound from licorice root. *Food Processing and Preservation Journal*. 2011 June 3;2:1-22. Dor: 20.1001.1.24233544.1390.3.2.1.7
13. Kumar M, Tomar M, Potkule J, Punia S, Dhakane-Lad J, Singh S, Dhumal S, Pradhan PC, Bhushan B, Anitha T, Alajil O. Functional characterization of plant-based protein to determine its quality for food applications. *Food Hydrocolloids*. 2022 Feb 1;123:106986. Doi: 10.1016/j.foodhyd.2021.106986
14. Li Q, Zheng J, Ge G, Zhao M, Sun W. Impact of heating treatments on physical stability and lipid-protein co-oxidation in oil-in-water emulsion prepared with soy protein isolates. *Food Hydrocolloids*. 2020 Mar 1;100:105167. Doi: 10.1016/j.foodhyd.2019.06.012

15. Li X, Luo T, Wang L, Song H, Wang F, Weng Z, Zhou J, Xiang X, Xiong L, Shen X. Emulsifying properties of wheat germ protein: Effect of different ultrasonic treatment. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2023 Aug 1;98:106479. Doi: 10.1016/j.ultsonch.2023.106479
16. Lv C, Jia X, Li M, Yang J, Zhao G. Optimization of extraction process of crude protein from grape seeds by RSM. *Food science and technology research*. 2011;17(5):437-45. Doi: 10.3136/fstr.17.437
17. McClements DJ. Protein-stabilized emulsions. *Current opinion in colloid & interface science*. 2004 Dec 1;9(5):305-13. Doi: 10.1016/j.cocis.2004.09.003
18. O'sullivan JJ, Park M, Beevers J, Greenwood RW, Norton IT. Applications of ultrasound for the functional modification of proteins and nanoemulsion formation: A review. *Food Hydrocolloids*. 2017 Oct 1;71:299-310. Doi: 10.1016/j.foodhyd.2016.12.037
19. Östbring K, Nilsson K, Ahlström C, Fridolfsson A, Rayner M. Emulsifying and anti-oxidative properties of proteins extracted from industrially cold-pressed rapeseed press-cake. *Foods*. 2020 May 25;9(5):678. Doi: 10.3390/foods9050678
20. Papalamprou EM, Doxastakis GI, Kiosseoglou V. Chickpea protein isolates obtained by wet extraction as emulsifying agents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2010 Jan 30;90(2):304-13. Doi: 10.1002/jsfa.3816
21. Paraman I, Hettiarachchy NS, Schaefer C. Preparation of rice endosperm protein isolate by alkali extraction. *Cereal Chemistry*. 2008 Jan;85(1):76-81. Doi: 10.1094/CCHEM-85-1-0076
22. Ubaid M, Saini CS. Protein concentrate extracted from grape seeds: Impact of different pH levels on the amino acid composition, structural, thermal, morphological, and functional properties. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*. 2024 Dec 30;23(4):423-37. Doi: 10.17306/J.AFS.001252
23. Yan S, Xu J, Zhang S, Li Y. Effects of flexibility and surface hydrophobicity on emulsifying properties: Ultrasound-treated soybean protein isolate. *Lwt*. 2021 May 1;142:110881. Doi: 10.1016/j.lwt.2021.110881
24. Zayas, J.F. 1997. *Functionality of Proteins in Food*. 1st ed, Berlin/Heidelberg, Germany: Springer, 382p. Doi: 10.1007/978-3-642-59116-7. ISBN 978-3-642-63856-5.
25. Zhao Y, Wen C, Feng Y, Zhang J, He Y, Duan Y, Zhang H, Ma H. Effects of ultrasound-assisted extraction on the structural, functional and antioxidant properties of *Dolichos lablab* L. Protein. *Process Biochemistry*. 2021 Feb 1;101:274-84. Doi: 10.1016/j.procbio.2020.11.027
26. Zhou T, Li Q, Zhang J, Bai Y, Zhao G. Purification and characterization of a new 11S globulin-like protein from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *European Food Research and Technology*. 2010 Mar;230:693-9. Doi: 10.1007/s00217-009-1211-0
27. Zhou T, Zhang T, Liu W, Zhao G. Physicochemical characteristics and functional properties of grape (*Vitis vinifera* L.) seeds protein. *International journal of food science & technology*. 2011 Mar;46(3):635-41. Doi: 10.1111/j.1365-2621.2010.02532.x

Optimizing the Emulsifying Capacity and Emulsion Stability of Grape Seeds Protein Using Response Surface Methodology

Mohsen Ramezani¹, Nafiseh Zamindar^{2*}

1- MSc Student of Food Science and Technology, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

2- Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

Abstract

Grape seed, a byproduct of grape processing plants, contain a significant amount of natural protein that can be used as an additive in food production. Information on grape seed protein, including methods of extractions and isolation, as well as nutritional value, is limited. This study aimed to optimize the extraction process to maximize the emulsifying capacity and emulsion stability of grape seed protein. To achieve this, the effects of four independent extraction variables: ultrasonic bath time (2-18 minutes) and temperature (20-40°C), pH (9-11), and centrifugation temperature (4-20°C) on the functional properties of emulsifying capacity and emulsion stability of grape seed protein were investigated in 39 different runs using response surface methodology. Optimal conditions for maximum emulsifying capacity and stability were achieved at 17.9 minutes of ultrasonic bath at 36.3°C, pH of 9, and centrifugation at 13.7°C. Protein was extracted under optimized conditions with 3 replicates and its functional properties were compared with the predicted values using a t-test at 5% significance level, showing no significant difference. These results demonstrate the effectiveness of response surface methodology in optimizing the extraction process and the reliability of the selected model in predicting the functional properties of grape seed protein. Furthermore, grape seed protein extracted under optimized conditions possessed desirable emulsifying properties. Additionally, these results help design the process of optimal protein extraction from grape seeds for future use in food industry.

Keywords: Grape Seed Protein, Emulsifying Capacity, Emulsion Stability.

* Corresponding Author: n.zamindar@khuisf.ac.ir