



Extraction of proteins from grass pea (*Lathyrus sativus* L.) and Persian everlasting pea (*Lathyrus rotundifolius* L.) seeds using aqueous two-phase systems

Yeganeh Azimi¹ | Hossein Kiani² | Mohammad Mousavi³ |

Mahsa Mohseni⁴ | Mina Homayoonfal⁵

1. Corresponding Author, Department of Food Science, Technology, and Engineering, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. Email: azimi.yeganeh@ut.ac.ir
2. Department of Food Science, Technology, and Engineering, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. Email: hokiani@ut.ac.ir
3. Department of Food Science, Technology, and Engineering, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. Email: mousavi@ut.ac.ir
4. Department of Food Science, Technology, and Engineering, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. Email: mahsa.mohseni@ut.ac.ir
5. Research Center for Biochemistry and Nutrition in Metabolic Diseases, Institute for Basic Sciences, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran. Email: mina.homayoonfal@gmail.com

Article Info

Article type: Research Article

Article history:

Received: July. 22, 2025

Revised: Sep. 26, 2025

Accepted: Oct. 1, 2025

Published online: Autumn 2025

Keywords:

Aqueous two-phase systems,
Electrophoresis profile,
Grass pea,
Persian everlasting pea

ABSTRACT

This study investigated the extraction of proteins from grass pea (*Lathyrus sativus* L.) and Persian everlasting pea (*Lathyrus rotundifolius* L.) seeds under varying pH levels and sodium chloride (NaCl) concentrations, as well as using aqueous two-phase systems (ATPSs). The lowest protein extractability was observed at pH 4, whereas the highest extractability occurred at pH 9.5 in distilled water. The results indicate that the presence of salt under alkaline conditions did not significantly enhance extractability compared to salt-free alkaline solutions. An ATPS comprising polyethylene glycol (PEG, 4000 g/mol) and arabic gum was developed and evaluated for protein extraction and separation. In the formed system, PEG and arabic gum preferentially migrated to the top and bottom phases, respectively. Optimal extraction conditions—20% PEG, 1% arabic gum, a solid-to-liquid ratio of 1:10, particle size of 50 mesh, and a temperature of 25 °C—yielded a maximum extraction efficiency of approximately 63%. SDS-PAGE electrophoresis profiles revealed a clear phase-dependent partitioning pattern, where low-molecular-weight subunits (≤ 25 kDa) preferentially migrated to the top phase, while higher-molecular-weight subunits (> 50 kDa) predominantly partitioned into the bottom phase. This research demonstrates that aqueous two-phase systems (ATPS) are an effective, environmentally friendly, and cost-effective method for the extraction and fractionation of proteins from grass pea and Persian everlasting pea seeds.

Cite this article: Azimi; Yeganeh, Kiani; Hossein, Mousavi; Mohammad, Mohseni; Mahsa & Homayoonfal; Mina (2025) Extraction of proteins from grass pea (*Lathyrus sativus* L.) and Persian everlasting pea (*Lathyrus rotundifolius* L.) seeds using aqueous two-phase systems, *Iranian Journal of Biosystem Engineering*, 56 (3), 21-42. <https://doi.org/10.22059/ijbse.2025.398504.665605>

© The Author(s).

Publisher: The University of Tehran Press.

DOI: <https://doi.org/10.22059/ijbse.2025.398504.665605>



EXTENDED ABSTRACT

Introduction

In recent years, due to population growth and increasing economic and environmental concerns, plant-based proteins have gained significant attention as sustainable alternatives to animal-derived proteins. *Lathyrus* species are annual legumes from the Fabaceae tribe that exhibit remarkable adaptability to harsh environmental conditions. Among these, grass pea (*Lathyrus sativus* L.) and Persian everlasting pea (*Lathyrus rotundifolius* L.) are underutilized yet promising protein sources. The efficiency of protein extraction depends on factors such as the target application, available resources, and extraction technique. Aqueous two-phase systems (ATPSs) have recently attracted attention as a mild and efficient approach for the extraction and purification of biomolecules. This study aimed to investigate protein extraction from grass pea (GP) and Persian everlasting pea (PEP) seeds using different extraction conditions, and to characterize the extracted proteins using SDS-PAGE.

Materials and Methods

Protein was extracted from GP and PEP seed flours using conventional alkaline extraction at different pH values and NaCl concentrations (0, 0.2, 0.6, and 1 M). An aqueous two-phase system was also applied for protein extraction. The binodal curve for PEG (polyethylene glycol, 4000 g/mol) and arabic gum was determined using the turbidity (cloud point) method. The optimal ATPS parameters were then selected for protein extraction. SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis) was used to estimate the molecular weight distribution of the extracted polypeptides.

Results

The results showed that the highest and lowest protein extractability occurred at pH 9.5 and pH 4, respectively, for both GP and PEP in distilled water. Around the isoelectric point (pI), protein extractability decreased due to reduced electrostatic repulsion between protein molecules as the net charge approached zero. Although maximum extractability was also observed at pH 9.5 with NaCl concentrations of 0.2 and 0.6 M, it was lower than the extractability achieved with distilled water. At 1 M NaCl, the lowest and highest protein extractability occurred at pH 2.5 and pH 8.5, respectively. Overall, the use of NaCl solutions did not significantly improve protein extractability compared to distilled water.

In ATPS, increasing PEG concentration enhanced the volume of the top phase (PEG-rich phase), and extraction efficiency improved up to 20% PEG but declined at 25% due to increased viscosity. Similarly, raising gum arabic concentration from 0.5% to 1% improved extraction, while higher concentrations reduced yield. Smaller particle sizes (up to 50 mesh) increased extraction efficiency, likely due to more effective release of intracellular contents. The optimal solid-to-liquid ratio was 1:10, and extraction yield improved with increasing temperature up to 25 °C, but declined beyond 30 °C, possibly due to protein denaturation or reduced phase separation efficiency.

SDS-PAGE revealed polypeptide bands ranging from 19 to 120 kDa in PEP and 18 to 140 kDa in GP. In the top phase of ATPS, dominant subunits for PEP were observed at approximately 19, 24, 35, and 40 kDa, and for GP at 18, 26, 35, and 40 kDa. In the bottom phase, subunits around 35, 50, 75, and 120 kDa were detected in PEP, and 35, 60, 70, and 140 kDa in GP.

Conclusions

The results indicated that salt addition did not significantly improve protein extraction over distilled water under alkaline conditions. The ATPS composed of PEG 4000 and arabic gum effectively facilitated the extraction and separation of proteins from GP and PEP seeds. PEG and arabic gum preferentially migrated to the top and bottom phases, respectively. Maximum extraction efficiency (~63%) was achieved under optimal conditions: 20% PEG, 1% arabic gum, a solid–liquid ratio of 1:10, particle size of 50 mesh, and temperature of 25 °C. Electrophoretic analysis demonstrated that low-molecular-weight polypeptides (≤ 25 kDa) migrated primarily to the top phase, whereas higher-molecular-weight polypeptides (> 50 kDa) accumulated in the bottom phase. Overall, this study confirms that aqueous two-phase systems are efficient, eco-friendly, and cost-effective tools for the extraction and fractionation of both hydrophilic and hydrophobic proteins from underutilized legumes such as grass pea and Persian everlasting pea.

Author Contributions

Yeganeh Azimi (YA), Hossein Kiani (HK), Seyed Mohammad Mousavi (SMM), Mahsa Mohseni (MM), Mina Homayoonfal (MH). Conceptualization was contributed by (YA) and (HK). Data Curation was involved by (YA) and (MM). Formal analysis was done by (YA) and (MH). Investigation was performed by (YA). Methodology did by (YA) and (HK). Project administration was carried out (HK) and (SMM). Supervision

was responsible by (HK) and (SMM). Writing—original draft was done by (YA). Writing—review and editing did by (YA), (MK) and (MH). All authors have read and agreed to the final version of the manuscript.

Data Availability Statement

Research data are not shared.

Acknowledgment

This research was supported by University of Tehran, Iran. We thank our colleagues from Bioprocessing and Biodetection lab of Department of Food Science and Technology, University of Tehran.

Ethical considerations

The authors avoided data fabrication, falsification, plagiarism, and misconduct.

Conflict of interest

The author declares no conflict of interest.

استخراج پروتئین‌ها از دانه‌های خلر (*Lathyrus sativus* L.) و نیسی (*Lathyrus rotundifolius* L.) با استفاده از سیستم های دو فاز آبی

یگانه عظیمی^۱ | حسین کیانی^۲ | محمد موسوی^۳ | مهسا محسنی^۴ | مینا همایونفال^۵

۱. نویسنده مسئول، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه:

azimi.yeganeh@ut.ac.ir

۲. گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: hokiani@ut.ac.ir

۳. گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: mousavi@ut.ac.ir

۴. گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: mahsa.mohseni@ut.ac.ir

۵. مرکز تحقیقات بیوشیمی و تغذیه در بیماری‌های متابولیک، مؤسسه علوم پایه، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران. رایانامه:

mina.homayoonfal@gmail.com

چکیده

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: مقاله پژوهشی

این پژوهش به بررسی استخراج پروتئین از دانه‌های خلر (*Lathyrus sativus* L.) و نیسی (*Lathyrus rotundifolius* L.) در شرایط مختلف pH و غلظت‌های گوناگون نمک کلرید سدیم (NaCl) و همچنین سیستم‌های دو فاز آبی (ATPS) می‌پردازد. کمترین مقدار قابلیت استخراج پروتئین در pH برابر با ۴ و بیشترین آن در pH برابر با ۹/۵ با استفاده از آب مقطر به دست آمد. نتایج نشان داد که افزودن نمک در شرایط قلیایی موجب افزایش معنادار قابلیت استخراج در مقایسه با محلول‌های قلیایی بدون نمک نمی‌شود. در ادامه، سیستمی دو فاز بر پایه پلی‌اتیلن گلیکول (PEG) با وزن مولکولی ۴۰۰۰ گرم بر مول و صمغ عربی طراحی و برای استخراج و جداسازی پروتئین‌ها از هر دو نوع دانه مورد ارزیابی قرار گرفت. در سیستم تشکیل یافته، PEG و صمغ عربی به ترتیب ترجیحاً به فازهای بالایی و پایینی مهاجرت کردند. بالاترین بازده استخراج، معادل با حدود ۶۳ درصد، در شرایط بهینه شامل ۲۰ درصد PEG، یک درصد صمغ عربی، نسبت جامد به مایع ۱:۱۰، اندازه ذرات با مش ۵۰ و دمای ۲۵ °C حاصل شد. پروفایل‌های الکتروفورز (SDS-PAGE) الگوی تقسیم‌بندی وابسته به فاز واضحی را نشان داد که در آن زیرواحدهای با وزن مولکولی کم (۲۵ کیلو دالتون و کمتر) عمدتاً به فاز بالایی و زیرواحدهای با وزن مولکولی بالاتر (بیش از ۵۰ کیلو دالتون) به فاز پایینی مهاجرت کردند. نتایج این تحقیق نشان داد که سیستم‌های ATPS روشی مؤثر، سازگار با محیط‌زیست و مقرون به صرفه برای استخراج و تفکیک پروتئین‌ها از دانه‌های خلر و نیسی هستند.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۴/۳۱

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۷/۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۷/۹

تاریخ انتشار: پاییز ۱۴۰۴

واژه‌های کلیدی:

سیستم دو فاز آبی،

پروفایل الکتروفورز،

خلر،

نیسی

استناد: عظیمی؛ یگانه؛ کیانی؛ حسین؛ موسوی؛ محمد؛ محسنی؛ مهسا؛ همایونفال؛ مینا (۱۴۰۴) استخراج پروتئین‌ها از دانه‌های خلر (*Lathyrus sativus* L.) و نیسی (*Lathyrus rotundifolius* L.) با استفاده از سیستم های دو فاز آبی، مجله مهندسی بیوسیستم ایران/ ایران، ۵۶ (۳)، ۴۲-۲۱.



<https://doi.org/10.22059/ijbse.2025.398504.665605>

© نویسندگان.

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

DOI: <https://doi.org/10.22059/ijbse.2025.398504.665605>

مقدمه

با رشد جمعیت جهانی و افزایش آگاهی درباره تغذیه سالم، نیاز به شناسایی منابع پروتئینی جدید، به‌ویژه گیاهی، افزایش یافته است. دانه‌های حبوبات به دلیل ترکیب مناسب اسیدهای آمینه، کربوهیدرات‌های پیچیده و فیبر، مورد توجه قرار گرفته‌اند. استفاده از آن‌ها در فرمولاسیون مواد غذایی برای بهبود کیفیت تغذیه‌ای به شدت افزایش یافته و محور بسیاری از مطالعات اخیر است (Deng et al., 2019; Gundogan et al., 2019; Karaca, 2020; Ma et al., 2018; Shevkani et al., 2019). با این وجود، بخشی از دانه‌های حبوبات به علت ویژگی‌های فیزیکی نظیر اندازه کوچک یا بافت سخت، مصرف مستقیم غذایی نداشته و عمدتاً در خوراک دام استفاده می‌شوند؛ این در حالی‌ست که این دانه‌ها سرشار از ترکیبات ارزشمند از جمله پروتئین، نشاسته، روغن و پلی‌فنول‌ها هستند که قابلیت استفاده در محصولات غذایی با ارزش افزوده را دارند (Pastor-Cavada, Juan et al., 2009). جایگزینی محصولات کشاورزی صنعتی به جای گونه‌های بومی، موجب از بین رفتن گیاهان دارویی و ارزشمند، نظیر جنس *Lathyrus* شده است. این جنس از خانواده‌ی باقلانیان (Fabaceae) محسوب می‌شود و شامل بیش از ۲۰۰ گونه‌ی گیاهی بوده که به دلیل مقاومت بالا در شرایط متنوع، به‌ویژه در مناطق مدیترانه‌ای و آمریکای شمالی و جنوبی، گسترش یافته است (Qayyum et al., 2012; Romano et al., 2019). دانه‌ی خلر با نام علمی *Lathyrus sativus L.* یکی از منابع غنی پروتئین و کربوهیدرات در میان حبوبات به‌شمار می‌رود. خلر مانند نخود و باقلا، دارای مقدار زیادی نشاسته و کمی اسیدهای چرب غیراشباع است. ترکیب مواد معدنی موجود در خلر نیز مشابه سایر حبوبات مهم می‌باشد (Mehr & Koocheki, 2021; Youshanlouei et al., 2022). گونه‌ی دیگر از جنس *Lathyrus* دانه‌ی نیسی با نام علمی *Lathyrus rotundifolius L.* است که همانند سایر بقولات، حاوی ۲۰ تا ۲۵ درصد پروتئین بوده، اما تاکنون کمتر مورد توجه پژوهشگران و صنایع غذایی قرار گرفته است (Youshanlouei et al., 2024).

فرآیند استخراج پروتئین به‌طور معمول با حل کردن منبع پروتئینی در محیط‌هایی با pH دور از نقطه‌ی ایزوالکتریک آغاز می‌شود؛ چراکه تعیین pH مناسب، یکی از عوامل کلیدی در کارایی استخراج است. در ادامه، با تنظیم pH به مقدار نزدیک به نقطه‌ی ایزوالکتریک، پروتئین‌های محلول به‌صورت انتخابی رسوب داده می‌شوند (Feyzi et al., 2017; Hadnadev et al., 2017; Pojić et al., 2018). یکی دیگر از روش‌های مؤثر در استخراج پروتئین، استفاده از سیستم‌های دو فاز آبی (ATPS) است که به دلیل مزایای متعدد خود، توجه بسیاری را در حوزه‌ی زیست‌فناوری و صنایع غذایی به خود جلب کرده‌اند. ویژگی‌های مطلوب این سیستم‌ها شامل ویسکوزیته پایین، تشکیل حداقل امولسیون، عدم نیاز به حلال‌های آلی فرار، جدایی سریع فازها، بازده بالا و زیست‌سازگاری بالا است (S. E. Dreyer, 2008; Garcia et al., 2018; Pojić et al., 2018). سیستم‌های ATPS از جمله تکنیک‌های مایع-مایع در استخراج زیست‌مولکول‌ها هستند که کاربرد گسترده‌ای در بازیابی اولیه یا خالص‌سازی نسبی فرآورده‌های زیستی متنوعی از جمله پروتئین‌ها، مواد ژنتیکی، نانوذرات و ترکیبات با وزن مولکولی پایین دارند (سبوحی، ۱۳۹۱). از مزایای این روش می‌توان به قابلیت افزایش مقیاس، ادغام با مراحل دیگر فرآیند و محیط غیرسمی آن اشاره کرد که از دنا توره شدن ترکیبات حساس جلوگیری می‌کند. همچنین، سرعت بالای فرایند و سطح پایین آلودگی، این روش را از نظر اقتصادی مقرون به‌صرفه می‌سازد (Peters et al., 1987). ATPS روشی بسیار ملایم برای خالص‌سازی پروتئین‌ها به‌شمار می‌رود؛ به‌طوری‌که معمولاً در این فرایند، دنا توره شدن یا از دست رفتن فعالیت بیولوژیکی پروتئین‌ها مشاهده نمی‌شود. این ویژگی عمدتاً به دلیل محتوای بالای آب و کشش سطحی پایین موجود در سیستم است که از ساختار طبیعی پروتئین محافظت می‌کند. علاوه بر آن، حضور پلیمرها در فازها ممکن است نقش پایداری بخش ایفا کرده و به حفظ ساختار فضایی و عملکرد زیستی پروتئین‌ها کمک نماید (Asenjo & Andrews, 2011; Khan et al., 2019). سیستم‌های دو فاز آبی زمانی شکل می‌گیرند که دو پلیمر (مانند پلی‌اتیلن گلیکول، دکستران، یا پلی‌پروپیلن گلیکول)، یک پلیمر و یک نمک (نظیر فسفات، سولفات، سیترات و ...) یا دو نمک، در غلظت‌هایی بالاتر از غلظت بحرانی یا تحت شرایط دمایی خاص، با یکدیگر مخلوط شده و منجر به تشکیل دو فاز مجزای کاملاً هیدروفیل شوند (S. E. Dreyer, 2008; Garcia et al., 2018; Pojić et al., 2018). به‌منظور استخراج و خالص‌سازی در سیستم‌های دو فاز آبی، پس از بارگذاری نمونه و اختلاط اجزای سیستم، دو فاز به‌تدریج از یکدیگر جدا می‌شوند. این جدایش تا رسیدن به تعادل فاز آبی ادامه یافته و در پایان، ترکیب هدف به‌طور ترجیحی به یکی از فازها منتقل می‌شود. در این فرایند، پارامتر کلیدی تحت عنوان ضریب تفکیک تعریف

می‌شود که نسبت غلظت زیست‌مولکول مورد نظر در فاز بالا به فاز پایین را نشان می‌دهد و تحت تأثیر عواملی چون نوع و ویژگی پلیمر مورد استفاده، زمان تماس اجزا و دمای سیستم قرار دارد (Domínguez-Puerto et al., 2018; Uversky et al., 2024).

در سیستم‌های دو فاز آبی، دو نوع رایج شامل پلیمر-نمک و پلیمر-پلیمر برای جداسازی پروتئین‌ها استفاده می‌شود. اما سیستم‌های پلیمر-نمک با چالش‌هایی مانند هزینه بالا، نگرانی‌های زیست‌محیطی و دشواری در بازیابی ترکیبات مواجه‌اند. همچنین، حلالیت محدود پروتئین‌های آمفی‌فیلیک می‌تواند منجر به تجمع آن‌ها و آسیب به ساختار پروتئین‌های حساس شود. در سیستم‌های دو فاز پلیمر-پلیمر که از دو پلیمر آب‌دوست با ساختارهای متفاوت تشکیل شده‌اند، تا حد زیادی محدودیت‌های سیستم پلیمر-نمک برطرف شده است. این سیستم‌ها، به دلیل محتوای بالای آب، محیطی مناسب برای افزایش حلالیت و پایداری پروتئین‌ها و سایر زیست‌مولکول‌ها فراهم می‌کنند (Saravanan et al., 2008; Yang et al., 2010). در میان انواع سیستم‌های دو فاز آبی پلیمر-پلیمر، ترکیب پلی‌اتیلن گلیکول (PEG) و دکستران یکی از رایج‌ترین سیستم‌ها برای جداسازی پروتئین‌ها به‌شمار می‌رود (Platis & Labrou, 2006)؛ با این حال، استفاده از این سیستم‌ها با چالش‌هایی نظیر ویسکوزیته‌ی بالا و هزینه‌های اقتصادی قابل توجه همراه است. مطالعات تجربی نشان داده‌اند که در اغلب موارد، پلی‌اتیلن گلیکول، به دلیل حلالیت بالای خود در آب، به عنوان یکی از اجزای اصلی این سیستم‌ها انتخاب می‌شود (Freire & Pereira, 2019; Saravanan et al., 2008). پدیده‌ی پارتیشن‌بندی (تقسیم زیست‌مولکول‌ها بین دو فاز) در این سیستم‌ها، تابعی از ویژگی‌های سطحی پروتئین‌ها و مشخصات سیستم دو فاز می‌باشد. اگرچه مکانیسم دقیق پارتیشن‌بندی پیچیده بوده و پیش‌بینی آن آسان نیست، اما برخی روندهای مشخص در این زمینه قابل شناسایی هستند (Uversky et al., 2024). با توجه به این محدودیت‌ها، در پژوهش حاضر به جای استفاده از سامانه‌های رایج PEG-نمک، از یک سامانه‌ی پلیمر-پلیمر (PEG4000-صمغ عربی) بهره‌گیری شد؛ به عبارت دیگر، صمغ عربی به عنوان جایگزینی برای جزء نمکی انتخاب گردید تا ضمن حذف یون‌های معدنی و نیاز به مراحل نمک‌زدایی، محیطی پایدارتر، زیست‌سازگارتر و مناسب‌تر برای حفظ ساختار و عملکرد پروتئین‌ها فراهم شود. انتخاب صمغ عربی نسبت به سایر صمغ‌های طبیعی نیز به دلیل ویژگی‌های خاص آن صورت گرفت؛ از جمله حلالیت بسیار بالا در آب بدون نیاز به شرایط خاص، رفتار رئولوژیک پایدار در گستره وسیعی از pH و دما، سازگاری ایمن و غیرسمی بودن، و توانایی ایجاد برهم‌کنش مؤثر با پروتئین‌ها. افزون بر این، برخلاف برخی صمغ‌های دیگر مانند زانتان یا پکتین که ممکن است باعث افزایش بیش از حد ویسکوزیته یا محدودیت در فازبندی شوند، صمغ عربی به دلیل ویسکوزیته نسبتاً پایین و تشکیل سریع فازهای مجزا شرایط مناسب‌تری برای طراحی سیستم‌های دو فاز آبی فراهم می‌آورد. همچنین سابقه گسترده‌ی استفاده از صمغ عربی در صنایع غذایی و دارویی، انتخاب آن را به عنوان گزینه‌ای مقرون‌به‌صرفه و قابل اعتماد برای این پژوهش تقویت می‌کند. توزیع گروه‌های باردار، قطبی، آب‌دوست و آب‌گریز بر سطح پروتئین‌ها نقش مهمی در حلالیت و جدایش آن‌ها در سیستم‌های آبی دارد. ویژگی آب‌گریزی به عنوان عامل غالب در تقسیم پروتئین‌ها شناخته می‌شود، در حالی که تأثیر بار الکتریکی در سیستم‌های PEG-نمک کم و در سیستم‌های PEG-دکستران بیشتر است. همچنین، غلظت پروتئین یکی از عوامل کلیدی در رفتار پارتیشن‌بندی در ATPS است. در غلظت‌های پایین، ضریب تفکیک تقریباً ثابت باقی می‌ماند، اما در غلظت‌های بالاتر به دلیل اشباع نسبی سیستم، این ضریب تغییر می‌کند (Uversky et al., 2024; Vicente et al., 2019). با توجه به ارزش تغذیه‌ای بالای دانه‌های خمر و نیسی و عدم بهره‌برداری مؤثر از پتانسیل آن‌ها به عنوان منابع پروتئینی در صنایع غذایی، همچنین مزایای منحصر به فرد سیستم‌های دو فاز آبی در استخراج ترکیبات زیستی حساس، این پژوهش با هدف بررسی امکان‌پذیری استخراج پروتئین از این دو گونه با استفاده از سیستم دو فاز آبی پلیمر-پلیمر (PEG4000 و صمغ عربی) و ارزیابی بازده و ضریب تفکیک پروتئین در شرایط مختلف عملیاتی انجام شد.

پیشینه پژوهش

Gerzhova et al., (2016) به بررسی تأثیر pH، غلظت نمک (سدیم کلرید) و مقدار آرد کلزا بر کارایی استخراج پروتئین از کنجاله کلزا پرداختند. نتایج نشان داد که pH محیط استخراج بیشترین تأثیر را بر قابلیت استخراج دارد، در حالی که مقدار آرد و غلظت نمک تأثیرات متفاوتی بر استخراج‌پذیری پروتئین‌ها از خود نشان دادند. بیشینه‌ی قابلیت استخراج پروتئین (۱۲/۵۸ درصد) در شرایط pH برابر ۱۲، محیط بدون نمک، و با استفاده از ۱۵ درصد آرد به دست آمد. در مقابل، کمترین میزان قابلیت استخراج پروتئین در شرایط pH برابر ۱۰، غلظت نمک ۰/۰۱ و مقدار آرد ۱۰ درصد مشاهده شد. (Qayyum et al., 2012). چهار نوع از حبوبات رایج شامل نخود، عدس، لوبیا، و لوبیا چشم‌بلبلی را از نظر ترکیب شیمیایی، بازده استخراج پروتئین و ویژگی‌های عملکردی جدایه‌های پروتئینی مورد ارزیابی قرار دادند. بر اساس

نتایج، مقدار پروتئین خام به ترتیب در عدس ۳۱/۱۲ درصد، نخود ۲۲/۸۳ درصد، لوبیا ۲۲/۶۱ درصد، و لوبیا چشم‌بلبلی ۲۰/۰۹ درصد گزارش شد. در این مطالعه، از روش رسوب ایزوالکتریک برای بازیابی جدایه‌های پروتئینی از نمونه‌های بدون چربی این حبوبات استفاده گردید. آزمون الکتروفورز نیز نشان داد که باند‌های پلی‌پپتیدی جدایه‌های پروتئینی در محدوده‌ی چهار تا ۷۰ کیلو دالتون قرار دارند. در میان این حبوبات، عدس و نخود بیشترین بازده استخراج پروتئین و بهترین ویژگی‌های عملکردی را نشان دادند و در نتیجه، برای استفاده در فرمولاسیون محصولات غذایی غنی از پروتئین مناسب‌تر تشخیص داده شدند.

Mohseni et al., (2024) به بررسی شرایط جداسازی اسیدآمینه‌ی ال-سیترولین از بخش سفید پوست هندوانه^۱ با استفاده از سیستم‌های دو فاز آبی (ATPS) شامل مایع یونی و نمک دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات پرداختند. نتایج این مطالعه نشان داد که شرایط بهینه برای استخراج این ترکیب شامل غلظت نمک برابر با ۳۵ درصد، غلظت مایع یونی ۱/۶ مولار، اندازه ذرات با مش ۶۰، و زمان استخراج ۱۰ دقیقه است. Freire and Pereira (2019) به بررسی جداسازی دو پروتئین اصلی آب‌پنیر شیر بز، یعنی آلفا-لاکتوآلبومین و بتا-لاکتوگلوبولین، با استفاده از ATPS پرداختند. نتایج این مطالعه نشان داد که مالتودکسترین می‌تواند به عنوان جایگزینی مناسب برای دکستران در این نوع سیستم‌ها مورد استفاده قرار گیرد. همچنین مشخص شد که هر دو پروتئین مورد نظر، پس از فرآیند استخراج، تمایل بیشتری به توزیع در فاز غنی از مالتودکسترین از خود نشان می‌دهند. Domínguez-Puerto et al. (2018) جداسازی و تغلیظ پروتئین‌های آب‌پنیر را با استفاده از ATPS حاوی نمک سولفات آمونیوم $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ و پلی‌اتیلن گلیکول ۴۰۰۰ در دمای 25°C مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که حداقل بازیابی پروتئین و بیشترین حذف لاکتوز در مخلوط‌هایی با غلظت ۲۵ درصد PEG و ۱۲/۱ درصد نمک مشاهده شد. با کاهش غلظت PEG، بازده بازیابی پروتئین افزایش یافت؛ به گونه‌ای که در سیستم فاقد PEG، بیشینه‌ی بازیابی پروتئین حاصل گردید. de Barros et al. (2014) رفتار جداسازی یازده نوع اسیدآمینه مختلف را در سیستم‌های دو فاز آبی پلیمر/پلیمر بررسی و مدل‌سازی کردند. این سیستم‌ها شامل جفت‌هایی از پلیمرهای غیریونی نظیر پلی‌اتیلن گلیکول، دکستران، ایکون^۲ و فیکول^۳ بودند که در حضور محلول ۰/۱۵ مولار سدیم کلرید و بافر ۰/۰۱ مولار سدیم فسفات به کار گرفته شدند. نتایج حاصل، به شناسایی ویژگی‌های برهم‌کنش بین اسیدآمینه‌ها و فازهای مختلف و نیز ارائه‌ی مدل‌هایی برای پیش‌بینی رفتار پارتیشن‌بندی آن‌ها در چنین سیستم‌هایی کمک کرد. سبوحی (۱۳۹۱) استخراج پروتئین آلبومین را با استفاده از سیستم دو فاز آبی شامل پلی‌اتیلن گلیکول و نمک‌های مختلفی از جمله منیزیم سولفات، آمونیوم سولفات و سدیم سولفات مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که در میان این نمک‌ها، سیستم حاوی آمونیوم سولفات بالاترین ضریب توزیع پروتئین را دارا بود. همچنین مشخص شد که در غلظت‌های پایین نمک، بخش‌های آب‌دوست پروتئین در دسترس قرار گرفته و موجب پایداری بیشتر پروتئین در فاز آبی می‌شود. در مطالعه‌ی دیگر، Saravanan et al. (2008) به بررسی جداسازی پروتئین‌های اوآلبومین و میوگلوبین در سیستم دو فاز آبی شامل پلی‌اتیلن گلیکول (PEG) و پلی‌آکریلیک اسید (PAA) پرداختند. نتایج این تحقیق نشان داد که افزایش طول زنجیره پلیمر در فاز PEG، موجب افزایش راندمان جداسازی پروتئین‌ها می‌گردد. با این حال، افزایش وزن مولکولی PEG و دمای سیستم، تأثیر منفی بر جداسازی داشت. در مقابل، افزایش pH محیط و غلظت نمک سدیم کلرید، موجب بهبود بازده جداسازی گردید. به طور خاص، بهترین شرایط برای جداسازی در این مطالعه با استفاده از سیستم PEG 400-PAA، در دمای 20°C ، pH برابر با ۸، و غلظت یک مولار نمک سدیم کلرید حاصل شد. Chethana et al., (2006) از سیستم دو فاز آبی PEG و زانتان برای استخراج پروتئین آلبومین سرم گاوی (BSA) استفاده کردند. نتایج حاصل نشان داد که بخش قابل توجهی از پروتئین به فاز PEG وارد شد. این مطالعه همچنین به ویژگی‌های خاص سیستم اشاره دارد که امکان بازیابی زانتان پس از انجام فرایند استخراج را فراهم می‌سازد، که از منظر پایداری و بهره‌وری فرآیند، اهمیت قابل توجهی دارد.

روش‌شناسی پژوهش

بذر خلر (*Lathyrus sativus L.*) از مؤسسه‌ی تحقیقات دیم کشور و بذر نیسی (*Lathyrus Rotundifolius L.*) از بازار محلی شهرکرد خریداری شدند. صمغ عربی تجاری از شرکت زمزم با وزن مولکولی متوسط تقریبی $\sim 250\text{kDa}$ (بر اساس برگه مشخصات شرکت تولیدکننده) تهیه شد. سایر مواد شیمیایی استفاده شده در این پژوهش، دارای درجه خلوص آزمایشگاهی می‌باشند.

1. Watermelon Rind
2. Ucon
3. Ficoll

تعیین ویژگی‌های شیمیایی آرد دانه خلر و نیسی

به‌منظور استخراج پروتئین، ابتدا دانه‌های خلر و نیسی پس از پاک‌سازی، آسیاب شده و سپس با استفاده از الک استاندارد با مش ۵۰ غربال شدند. محتوای پروتئین آرد حاصل با روش کدال و ضریب تبدیل $N \times 6/25$ اندازه‌گیری شد. میزان چربی، رطوبت و خاکستر بر اساس دستورالعمل‌های رسمی AOAC تعیین گردید. همچنین مقدار فیبر خام با استفاده از دستگاه و روش *Ankom* بر اساس پروتکل‌های استاندارد تعیین شد (Intl, 1995).

اثر نمک و pH برای قابلیت استخراج پروتئین

برای بررسی اثر نمک و pH بر قابلیت استخراج پروتئین، آرد دانه خلر و نیسی در آب مقطر و محلول‌های سدیم کلرید با غلظت‌های ۰/۲، ۰/۶ و ۱ مولار به نسبت وزنی-حجمی ۱:۱۰ (گرم به میلی‌لیتر) مخلوط شده و به مدت ۲ ساعت با سرعت ۳۰۰ دور در دقیقه هم‌زده شدند. سوسپانسیون‌های حاصل به لوله‌های آزمایش منتقل شده و pH آن‌ها با استفاده از محلول‌های هیدروکلریک اسید و سدیم هیدروکسید (با غلظت‌های ۰/۱ و ۱ مولار) در محدوده‌ی pH ۲ تا ۱۰ تنظیم شد. در مرحله بعد، نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک قرار گرفتند و سپس ۳۰ دقیقه دیگر با هم‌زن مغناطیسی به‌طور مداوم مخلوط شدند. در نهایت، نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در سرعت $4000 \text{ g} \times$ سانتریفیوژ شدند (Achouri, Nail, & Boye, 2012). پس از جداسازی فاز مایع، محتوای پروتئین محلول با استفاده از روش برادفورد و آلبومین سرم گاوی به‌عنوان استاندارد، اندازه‌گیری گردید (Bradford, 1976).

ترسیم دیاگرام فاز برای سیستم دو فاز آبی پلی‌اتیلن گلیکول و صمغ عربی

رسم دیاگرام فاز یکی از مراحل کلیدی در طراحی و بهینه‌سازی استخراج به روش سیستم دو فاز آبی ATPS به‌شمار می‌رود. این دیاگرام‌ها امکان پیش‌بینی غلظت‌های لازم برای تشکیل سیستم دوفازی در شرایط تعادل، غلظت اجزای سازنده در فازهای بالا و پایین، و نسبت حجمی فازها را فراهم می‌سازند (Iqbal et al., 2016; Saravanan et al., 2006). در این پژوهش، دیاگرام فاز سیستم مورد نظر شامل PEG 4000 و صمغ عربی، با استفاده از روش تیتراسیون کدورت‌سنجی یا نقطه ابری (cloud point titration) تعیین گردید (Zhang et al., 2016). بدین منظور، مقدار مشخصی از محلول استوک ۵۰ درصد وزنی-وزنی PEG 4000 به درون یک بشر ۵۰ میلی‌لیتری خشک و از پیش وزن‌شده منتقل شد و وزن آن ثبت گردید. هم‌زمان، ترموستات بر دمای محیط تنظیم شد و محلول به آرامی هم‌زده شد. سپس محلول صمغ عربی (با غلظت تقریبی ۴۰ درصد وزنی-وزنی) به‌صورت قطره‌قطره به داخل بشر اضافه گردید تا زمانی که محلول دچار کدورت شده و این کدورت با هم‌زدن بیشتر برطرف نشود. در این مرحله، وزن محلول به‌عنوان m_1 ثبت گردید. در ادامه، به‌منظور برگشت محلول به وضعیت شفاف، آب مقطر به‌صورت قطره‌قطره افزوده شد و پس از شفاف شدن، مجدداً وزن نهایی محلول به‌عنوان m_2 ثبت شد. این فرآیند در دفعات متعدد تکرار گردید و مقادیر مربوط به نقاط ابری به‌صورت متوالی m_3 تا m_n اندازه‌گیری شدند. داده‌های به‌دست‌آمده به‌منظور ترسیم منحنی فاز و تعیین ناحیه تشکیل سیستم دوفازی به‌کار گرفته شد.

$$C_1(\%) = \left(\frac{m_1 - m_a}{m_n - m_a} \right) \times 100 \quad \text{رابطه (۱)}$$

$$C_2(\%) = \left(\frac{(m_1 - m_2) \dots + (m_{n-1} - m_{n-2})}{m_n - m_a} \right) \times 100 \quad \text{رابطه (۲)}$$

بر اساس روابط (۱) و (۲)، کسر جرمی پلی‌اتیلن گلیکول (C_1) و صمغ عربی (C_2) در هر ترکیب سیستم دوفازی محاسبه شد و با استفاده از این داده‌ها، نمودار فاز سیستم رسم گردید. منحنی حاصل از ترسیم دیاگرام فاز، ترکیب‌های مختلف سیستم را به دو ناحیه مجزا تقسیم می‌کند. ناحیه اول که در زیر منحنی قرار دارد، مربوط به شرایطی است که تنها یک فاز آبی همگن تشکیل می‌شود و به‌عنوان ناحیه تک‌فازی شناخته می‌شود. در مقابل، ناحیه دوم که بالای منحنی قرار دارد، معرف ترکیب‌هایی است که منجر به تشکیل دو فاز مجزای آبی می‌شوند. این تقسیم‌بندی فاز، مبنایی برای انتخاب شرایط بهینه در طراحی فرایند استخراج پروتئین با استفاده از سیستم دو فاز آبی فراهم می‌آورد (همایونفال، ۱۳۹۷).

آماده سازی سیستم دو فاز آبی

برای استخراج پروتئین با استفاده از سیستم دو فاز آبی، از دو روش مجزا بهره‌گیری شد که در هر دو، غلظت از پیش تعیین‌شده‌ی پلیمرها بر اساس منحنی دوفازی ترسیم‌شده مورد استفاده قرار گرفت. مطابق با مطالعات پیشین، pH نهایی سیستم در هر دو روش روی ۸/۵ تنظیم شد (Iqbal et al., 2016; Jiang et al., 2020; Saravanan et al., 2008).

روش الف: پلی اتیلن گلیکول (PEG) و صمغ عربی به صورت جداگانه در غلظت‌های مشخص مطابق منحنی دوفازی در آب مقطر حل شده و به مدت ۳۰ دقیقه هم زده شدند. به طور هم زمان، سوسپانسیونی از آرد نیشی و خلر در آب مقطر تهیه گردید و pH آن با استفاده از محلول سود ۰/۱ و ۱ مولار روی ۹/۵ تنظیم شد. این سوسپانسیون به مدت ۶۰ دقیقه تحت هم زدن قرار گرفت و سپس برای حذف ناخالصی‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در سرعت $4000 \times g$ سانتریفیوژ شد. پس از آن، محلول‌های پلیمری و نمونه‌ی آردی با یکدیگر مخلوط گردیدند و pH نهایی ترکیب بر روی ۸/۵ تنظیم شد تا محیط همگن حاصل گردد. مخلوط به دست آمده برای جداسازی فازها به مدت ۱۰ دقیقه در $3000 \times g$ سانتریفیوژ شد. سپس، نمونه‌ها در دمای محیط به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند تا شرایط تعادل کامل بین فازها برقرار شود. در پایان، حجم فازهای بالا و پایین اندازه گیری شده و مقدار پروتئین در هر فاز به صورت جداگانه با استفاده از روش برادفورد تعیین گردید. لازم به ذکر است که به دلیل ویسکوزیته‌ی بالای سیستم‌های پلیمری، کنترل رقت نمونه‌ها پیش از سنجش پروتئین امری ضروری بود.

روش ب: ابتدا محلول‌های استوک PEG و صمغ عربی تهیه و سپس مقدار مشخصی از آرد و آب مقطر به آن‌ها افزوده شد. pH کل سیستم روی ۸/۵ تنظیم شده و سوسپانسیون حاصل به مدت ۶۰ دقیقه تحت هم زدن قرار گرفت. در ادامه، ترکیب مذکور به مدت ۱۰ دقیقه در $3000 \times g$ سانتریفیوژ شد تا فازها از یکدیگر جدا شوند و ناخالصی‌ها حذف گردند. مشابه با روش نخست، برای اطمینان از دستیابی به تعادل کامل، سوسپانسیون به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط نگهداری شد. پس از رسیدن به تعادل، حجم فازهای بالا و پایین اندازه گیری شد و مقدار پروتئین موجود در هر فاز با استفاده از روش برادفورد مورد ارزیابی قرار گرفت.

تعیین پارامترهای فرآیند ATPS

پارامترهای فرآیند که به منظور ارزیابی فرآیند جداسازی توصیف می‌شود به صورت نسبت حجمی^۱ (R)، ضریب تفکیک^۲ (K) و راندمان استخراج^۳ (E) با معادلات زیر محاسبه شدند (Garcia et al., 2018; Mohseni et al., 2024).

$$R = V_T / V_B \quad \text{رابطه ۳}$$

$$K = C_T / C_B \quad \text{رابطه ۴}$$

$$E (\%) = \frac{C_T V_T}{C_T V_T + C_B V_B} = \frac{KR}{1 + KR} \quad \text{رابطه ۵}$$

نسبت حجمی فازها به صورت نسبت حجم فاز بالایی (V_T) به حجم فاز پایینی (V_B) محاسبه شد. همچنین، ضریب تفکیک پروتئین‌ها به صورت نسبت غلظت پروتئین در فاز بالا (C_T) به غلظت آن در فاز پایین (C_B) تعریف گردید. راندمان استخراج به عنوان شاخصی از کارایی استخراج، با در نظر گرفتن هر دو عامل نسبت حجمی و ضریب تفکیک تعیین شد.

همچنین راندمان استخراج تحت شرایط مختلف عملیاتی بررسی گردید. این شرایط شامل غلظت‌های متفاوت پلیمرها بر اساس دیگرام فاز، اندازه ذرات آرد با مش‌های ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰، نسبت‌های مختلف جامد به مایع (۱:۱۰، ۱:۱۵، ۱:۲۰ و ۱:۵)، و دماهای ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۴۰ درجه سلسیوس بود. این متغیرها به منظور تعیین شرایط بهینه استخراج پروتئین از دانه‌های خلر و نیشی در سیستم دو فازی آبی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

تعیین الگوی الکتروفورز (SDS-PAGE)

به منظور بررسی فراکسیون‌های پروتئینی، از روش SDS-PAGE استفاده شد. این آزمون در قالب ژل عمودی شامل ۱۲ درصد ژل جداکننده آکریل آمید و ۵ درصد ژل متراکم کننده (Bio-Rad Laboratories, Mini-Protein 3 Cell) صورت گرفت. نمونه‌ها در دمای 95°C درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه در بافر نمونه احیا کننده (۵۰ میلی مولار Tris HCl، ۵ میلی مولار EDTA، ۱۲/۵ میلی مولار pH ۸، ۲ درصد SDS، ۱ درصد β -مرکاپتواتانول و ۰/۰۲ درصد برموفنل آبی) واسرشته شدند. سپس نمونه‌ها توسط سرنگ مخصوص به چاهک‌ها تزریق و الکتروفورز با ولتاژ ثابت ۱۵۰ ولت اعمال شد. ژل‌ها با محلول رنگ آمیزی Coomassie Brilliant blue R-250 (Merck) KGaA به مدت ۱۲ ساعت رنگ آمیزی و به مدت ۴۸ ساعت در محلول ۱۰ درصد اسید استیک و متانول ۲۰ درصد، رنگ بری شدند.

1. Volume ratio
2. Partition coefficient
3. Extraction Yield

مارکر پروتئینی از قبل رنگ آمیزی شده (SMOBIO, PM1500) به عنوان استاندارد استفاده شد. در نهایت، ژل های رنگ آمیزی شده با استفاده از دستگاه ژل اسکنر اسکن گردیدند و موقعیت و شدت باندهای پروتئینی به طور تقریبی با نرم افزار ژل اسکنر آلفا به طور تقریبی محاسبه گردید (Laemmli, 1970). همچنین، برای تحلیل دقیق تر، تصویر ژل با استفاده از نرم افزار ImageJ پردازش و بررسی شد.

طرح و آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. کلیه آزمایش ها در سه تکرار مستقل انجام شدند و نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش گردیدند. جهت بررسی معناداری تفاوت میان تیمارها، از تحلیل واریانس (ANOVA) استفاده شد و مقایسه میانگین ها با آزمون چند دامنه ای توکی (Tukey) در سطح احتمال ۰/۰۵ صورت گرفت. همچنین، برای مقایسه بین دو نمونه مستقل، از آزمون T استفاده گردید.

یافته های پژوهشی و بحث

ترکیبات شیمیایی نیشی و خلر

ترکیب شیمیایی دانه های خلر و نیشی در جدول ۱ ارائه شده است. نتایج نشان داد که پروتئین با میانگین ۲۴/۶۵ درصد در نیشی و ۲۷/۶۷ درصد در خلر، یکی از ترکیبات اصلی این دانه ها به شمار می رود. مقدار پروتئین در دانه خلر به طور معناداری بیشتر از نیشی بود. همچنین، میزان چربی خام در دانه نیشی (۲/۴ درصد) بیشتر از خلر (۲/۰۶ درصد) گزارش شد. محتوای فیبر خام نیز در نیشی (۳/۰۷ درصد) بیشتر از خلر (۲/۹۷ درصد) بود، در حالی که میزان خاکستر در دانه خلر (۲/۹۲ درصد) نسبت به نیشی (۲/۳۸ درصد) مقدار بالاتری داشت. از سوی دیگر، مقدار رطوبت در دو نمونه اختلاف معناداری نداشت. مطابق با گزارش های پیشین، حبوبات معمولاً دارای ۲۰ تا ۳۰ درصد پروتئین در هر گرم ماده خشک هستند (Gundogan & Karaca, 2020). Feyzi et al. (2018) نیز میزان پروتئین دانه خلر را برابر با ۲۶/۱۶ درصد گزارش کرده اند که مقدار آن از میزان به دست آمده در مطالعه حاضر اندکی کمتر است. این اختلاف می تواند ناشی از عوامل مختلفی از جمله شرایط اقلیمی و منطقه ای کشت، تفاوت در ژنوتیپ یا رقم گیاهی مورد استفاده، تفاوت در روش های آماده سازی نمونه (مانند درجه آسیاب و شرایط رطوبت زدایی) و نیز نوع روش شیمیایی اندازه گیری پروتئین باشد. گزارش های مشابه نیز نشان داده اند که عوامل محیطی و روش شناختی می توانند باعث تغییرات قابل توجهی در ترکیب شیمیایی بقولات شوند (Qayyum et al., 2012; Romano et al., 2019).

جدول ۱. ترکیبات شیمیایی نیشی و خلر

ترکیب شیمیایی (درصد)	پروتئین	چربی	فیبر	خاکستر	رطوبت
آرد نیشی	۲۴/۶۵ $\pm$ ۰/۰۶ ^{b*}	۲/۴ $\pm$ ۰/۰۳ ^a	۳/۰۷ $\pm$ ۰/۰۱ ^a	۲/۳۸ $\pm$ ۰/۰۳ ^b	۹/۸۳ $\pm$ ۰/۰۵ ^a
آرد خلر	۲۷/۶۷ $\pm$ ۰/۰۵ ^a	۲/۰۶ $\pm$ ۰/۰۳ ^b	۲/۹۷ $\pm$ ۰/۰۲ ^b	۲/۹۲ $\pm$ ۰/۰۳ ^a	۹/۸۹ $\pm$ ۰/۰۷ ^a

* داده ها نشان دهنده میانگین ۳ تکرار $\pm$ انحراف استاندارد است. حروف مختلف در هر ستون نشان دهنده تفاوت های معنادار است ($p < ۰/۰۵$)

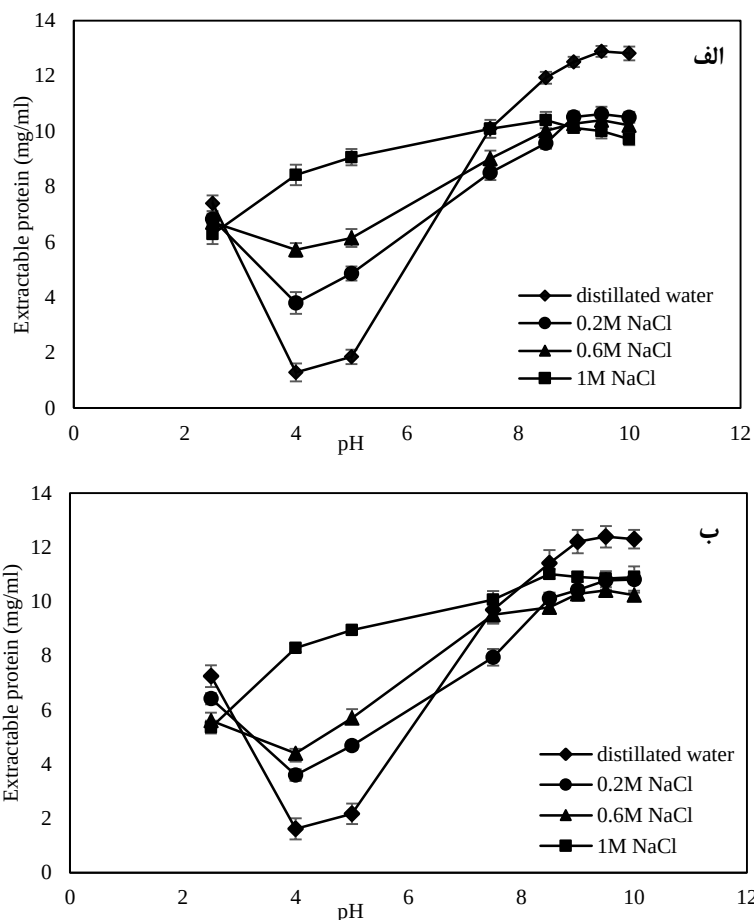
در این مطالعه مقایسه ترکیبات شیمیایی دو گونه ی خلر و نیشی نه صرفاً برای تأیید تفاوت های بدیهی گونه ای، بلکه با هدف شناسایی ظرفیت تغذیه ای و صنعتی هر یک از این دانه ها و تعیین نقاط قوت و محدودیت های آنها انجام شد. خلر به عنوان گونه ای شناخته شده تر، دارای محتوای پروتئین بالاتری بود، در حالی که نیشی مقادیر بیشتری فیبر خام و چربی نشان داد. چنین تفاوت هایی می تواند بر ویژگی های عملکردی در فرمولاسیون مواد غذایی اثرگذار باشد؛ به عنوان مثال، نیشی می تواند برای تولید محصولات غنی از فیبر مورد توجه قرار گیرد، در حالی که خلر گزینه ای مناسب تر برای محصولات با پروتئین بالا است. مقایسه بین گونه های مختلف یک جنس، همان طور که در پژوهش های پیشین نیز گزارش شده، روشی کاربردی برای شناسایی نقاط قوت تغذیه ای و عملکردی هر گونه است. این مقایسه امکان می دهد تا مشخص شود کدام گونه می تواند به عنوان منبع مناسب تری برای تولید محصولات غنی از پروتئین یا فیبر در صنایع غذایی مورد استفاده قرار گیرد.

بررسی فرآیند استخراج

اثر pH و غلظت نمک

قابلیت استخراج پروتئین از آرد چربی‌زدایی‌شده‌ی نیشی و خلر، در آب مقطر و محلول‌های سدیم کلرید با غلظت‌های ۰/۲، ۰/۶ و ۱ مولار و در محدوده‌ی pH بین ۲ تا ۱۰ مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصل در شکل ۴-۱ ارائه شده است. کمترین قابلیت استخراج پروتئین برای هر دو نمونه در آب مقطر و در pH حدود ۴ (نزدیک به نقطه ایزوالکتریک، pI) مشاهده شد. به‌طور مشابه، در حضور محلول‌های نمکی با غلظت‌های ۰/۲ و ۰/۶ مولار نیز حداقل حلالیت پروتئین در همین محدوده‌ی pH به‌دست آمد، در حالی که در pH های اسیدی و قلیایی، میزان استخراج افزایش یافت. افزایش یا کاهش pH نسبت به نقطه ایزوالکتریک موجب باردار شدن پروتئین (مثبت یا منفی) و در نتیجه افزایش برهم‌کنش بین مولکول‌های پروتئین و مولکول‌های آب می‌گردد. در مقابل، در نزدیکی pI، این برهم‌کنش‌ها کاهش می‌یابند که منجر به کاهش انحلال‌پذیری پروتئین در محیط می‌شود. بیشترین قابلیت استخراج پروتئین برای آرد نیشی و خلر در آب مقطر، به‌ترتیب برابر با $12/88 \pm 0/13$ و $12/38 \pm 0/39$ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مشاهده شد. افزودن نمک به محیط، موجب بهبود حل‌پذیری پروتئین در محدوده‌ی وسیع‌تری از pH گردید، اما در pH های قلیایی که حداکثر استخراج در آب مقطر مشاهده می‌شد، این اثر کاهش یافت. با افزایش غلظت نمک، تأثیر منفی آن در نزدیکی pH خنثی و حتی در نقطه ایزوالکتریک بارزتر شد. در غلظت یک مولار نمک، بیشترین میزان استخراج پروتئین برای آرد نیشی و خلر به‌ترتیب برابر با $10/40 \pm 0/18$ و $11/01 \pm 0/17$ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و در pH برابر ۸/۵ به‌دست آمد. همچنین، در همین غلظت نمک، حداقل قابلیت استخراج در pH پایین‌تر (حدود ۲/۵) مشاهده گردید. مطابق با یافته‌های حاضر، نتایج مطالعه Eromosele et al., (2008) نیز نشان داد که افزودن محلول نمک در مقایسه با آب مقطر، به‌ویژه در شرایط قلیایی، منجر به بهبود چشمگیری در استخراج پروتئین نمی‌شود. یکی از دلایل کاهش قابلیت استخراج پروتئین در حوالی نقطه ایزوالکتریک، کاهش بار خالص پروتئین است. در این شرایط، به‌دلیل نزدیک شدن بار سطحی پروتئین‌ها به صفر، دافعه‌ی الکترواستاتیکی بین ذرات به حداقل می‌رسد و در نتیجه، تمایل به تجمع و رسوب افزایش می‌یابد. این پدیده منجر به کاهش انحلال‌پذیری و در نهایت، افت استخراج پروتئین می‌شود. در مقابل، هنگامی که pH محیط بالاتر یا پایین‌تر از نقطه ایزوالکتریک قرار گیرد، بار خالص مولکول‌های پروتئینی افزایش می‌یابد. این امر موجب افزایش دافعه‌ی الکترواستاتیکی بین ذرات، کاهش پتانسیل تجمع و افزایش حل‌پذیری و استخراج‌پذیری پروتئین‌ها می‌گردد (Wang et al., 2011; Eromosele et al., 2008; Jyothirmayi et al., 2006; Tirgar et al., 2017). به بررسی استخراج پروتئین از دانه‌ی ماش و تعیین شرایط بهینه‌ی فرآیند پرداختند. بر اساس نتایج این مطالعه، پارامترهای استخراج بهینه شامل نسبت آرد به مایع برابر با ۱۰ درصد، دمای استخراج معادل $31/74^{\circ}\text{C}$ ، pH محیط استخراج برابر با ۸/۹۷، رسوب‌دهی معادل ۴/۴ و زمان استخراج برابر با ۳۳/۲۴ دقیقه پیشنهاد شدند.

به‌طور کلی، نمک‌ها در غلظت‌های پایین با ایجاد پدیده‌ای تحت عنوان ورود با نمک (salting-in) موجب افزایش حلالیت پروتئین می‌گردند. این اثر ناشی از تضعیف برهم‌کنش‌های پروتئین-پروتئین و در مقابل تقویت برهم‌کنش‌های پروتئین-حلال است که موجب پایداری بیشتر پروتئین‌ها در فاز محلول می‌شود (Zayas, 1997). در مقابل، در غلظت‌های بالاتر نمک، اثر معکوس خروج با نمک (salting-out) مشاهده می‌شود که ناشی از رقابت بین یون‌های نمک و مولکول‌های پروتئین برای جذب مولکول‌های آب است. از آنجا که آب تمایل بیشتری به اتصال به یون‌های نمک دارد، این پدیده منجر به کاهش دسترسی پروتئین‌ها به مولکول‌های آب، کاهش حلالیت، و در نهایت رسوب پروتئین‌ها می‌شود. به‌عنوان مثال، افزایش غلظت نمک به بیش از یک مولار موجب کاهش قابل توجه حلالیت پروتئین‌ها شده است (Gerzhova et al., 2016). این رفتار در مورد سایر منابع پروتئینی از جمله آلبومین آفتابگردان (Sara et al., 2020)، کنجاله کانولا (Gerzhova et al., 2016) و دانه سیب‌زمینی آفریقایی (Eromosele et al., 2008) نیز گزارش شده است. علاوه بر این، Eromosele et al. (2008) نشان دادند که در محلول حاوی ۱/۵ مولار نمک کلرید سدیم، نقطه ایزوالکتریک پروتئین به‌طور قابل توجهی تغییر کرده و از pH حدود ۵ به pH حدود ۲ جابجا می‌شود، که خود نشان‌دهنده تأثیر یون‌های نمک بر رفتار بار سطحی و حلالیت پروتئین‌ها در محلول‌های دوفازی است.

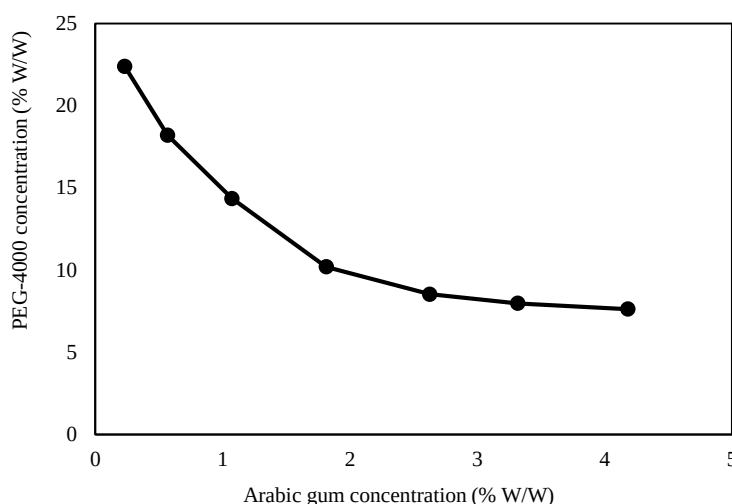


شکل ۱. اثر pH و غلظت نمک سدیم کلرید بر قابلیت استخراج پروتئین‌ها. (الف) نیسی؛ (ب) خلر

سیستم دو فاز آبی

دیاگرام فازی

شکل ۲، نمودار فازی سیستم دو فاز آبی تشکیل شده از PEG و صمغ عربی را نمایش می‌دهد. مطابق با این نمودار، ناحیه بالای منحنی نشان‌دهنده ترکیب‌هایی است که منجر به تشکیل فاز غنی از PEG می‌شوند. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود، صمغ عربی در غلظت‌های پایین‌تری نسبت به PEG قادر به ایجاد سیستم دوفازی است، در حالی که غلظت‌های پایین‌تر PEG زیر منحنی فازی قرار گرفته و در نتیجه سیستم تک‌فاز تشکیل می‌دهند. بنابراین، برای تشکیل فاز دوفازی در حضور صمغ عربی، به غلظت‌های بالاتری از PEG نیاز است. نقاط واقع در بالای منحنی فازی، معرف شرایطی هستند که در آن‌ها سیستم دو فاز آبی شکل می‌گیرد. این سیستم‌ها معمولاً دارای محتوای بالای آب، بیش از ۸۰ درصد وزنی، هستند (Chao & Shum, 2020). در مطالعه حاضر و بر اساس اطلاعات ارائه شده در شکل ۲، تأثیر غلظت‌های مختلف PEG (۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درصد) و صمغ عربی (۰.۵، ۱، ۲ و ۳ درصد) بر راندمان استخراج مورد بررسی قرار گرفت و به منظور تعیین شرایط بهینه، ارزیابی‌های لازم انجام شد. داده‌های حاصل از نمودار فازی نشان داد که به دلیل وزن مولکولی نسبتاً بالای صمغ عربی (حدود ۲۵۰ کیلو دالتون)، مقدار کمتری از آن برای تشکیل سیستم دوفازی کافی است. این رفتار را می‌توان به افزایش ویسکوزیته و توانایی بیشتر زنجیره‌های پلیمری بلندتر در برهم‌کنش با مولکول‌های آب و پروتئین نسبت داد که در نهایت منجر به جدایش سریع‌تر فازها و پایداری بیشتر سیستم می‌شود. این نتیجه مشابه الگوی مشاهده شده در سیستم‌های PEG-زانتان است (Chethana et al., 2006).



شکل ۲. دیاگرام فاز PEG 4000 (۵۰ درصد) و صمغ عربی (۴۰ درصد)

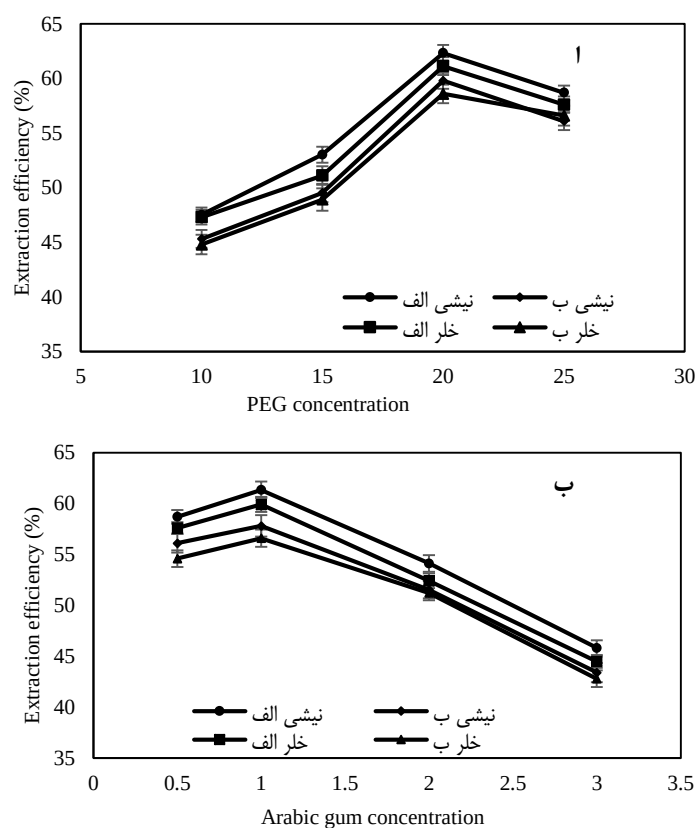
بهینه سازی شرایط استخراج با روش ATPS

اثر غلظت PEG و صمغ عربی بر راندمان استخراج ATPS

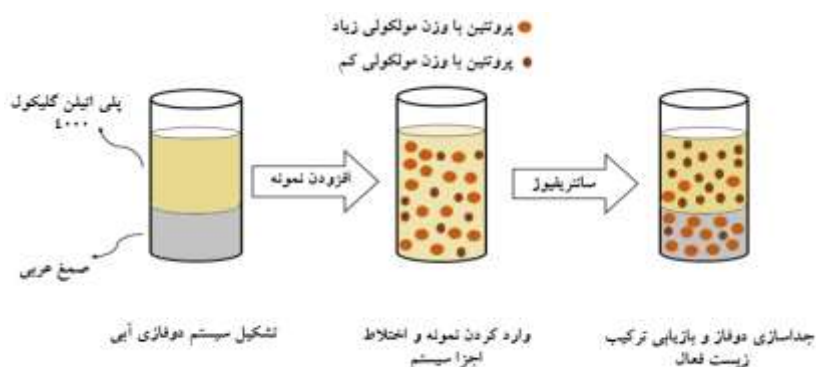
مقدار PEG یکی از پارامترهای کلیدی در طراحی سیستم دو فاز آبی بوده و نقش تعیین کننده‌ای در راندمان استخراج پروتئین ایفا می‌کند. برای بررسی اثر غلظت PEG، آزمایشی با ترکیب ثابت یک درصد صمغ عربی، نسبت جامد به مایع ۱:۱۰، آرد الک شده با مش ۵۰، و دمای ثابت ۲۵ °C انجام شد. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت PEG، حجم فاز بالا (فاز غنی از PEG) افزایش یافته و در مقابل، حجم فاز پایین (فاز غنی از صمغ عربی) کاهش یافت. همان گونه که در شکل ۳-الف مشاهده می‌شود، بازده استخراج پروتئین با افزایش غلظت PEG تا ۲۰ درصد روند افزایشی داشته و در غلظت ۲۵ درصد کاهش یافته است. این رفتار را می‌توان به این صورت تبیین کرد که افزایش غلظت PEG، سطح تماس و مکان‌های فعال بیشتری برای برهم کنش با مولکول‌های پروتئین فراهم می‌سازد که موجب بهبود استخراج می‌گردد. با این حال، در غلظت‌های بالاتر، افزایش ویسکوزیته محیط به‌طور چشمگیری نفوذپذیری به داخل ماتریکس نمونه را کاهش داده و در نتیجه از بازده کلی استخراج می‌کاهد. همچنین، افزایش غلظت PEG می‌تواند موجب کاهش حلالیت پروتئین‌ها در فاز بالا شود که منجر به خروج آن‌ها از فاز هدف و افت راندمان می‌گردد. بر اساس داده‌های شکل ۳-الف، راندمان استخراج در روش الف نسبت به روش ب برای هر دو دانه نیشی و خلر بالاتر گزارش شد. افزون بر آن، در هر دو روش، آرد نیشی نسبت به آرد خلر بازده استخراج نسبتاً بالاتری را نشان داد. با در نظر گرفتن بازده استخراج بهینه و ملاحظات عملی از جمله صرفه‌جویی در مصرف انرژی، غلظت ۲۰ درصد PEG به‌عنوان شرایط بهینه برای ادامه فرایند استخراج انتخاب شد.

تأثیر غلظت صمغ عربی بر راندمان استخراج پروتئین در شکل ۳-ب ارائه شده است. در این بررسی، سیستم شامل ۲۰ درصد PEG، نسبت جامد به مایع ۱:۱۰، آرد الک شده با مش ۵۰، و دمای ثابت ۲۵ °C بود. با افزایش غلظت صمغ عربی، حجم فاز بالایی کاهش و حجم فاز پایینی افزایش یافت. مطابق با یافته‌های شکل ۳-ب، راندمان استخراج با افزایش غلظت صمغ عربی از ۵/۰ درصد به ۱ درصد افزایش پیدا کرد، اما در غلظت‌های بالاتر از آن، کاهش معناداری در بازده استخراج مشاهده شد. افزایش اندک غلظت صمغ عربی، تحرک مولکول‌های کوچک پروتئین به سمت فاز غنی از PEG را افزایش داده و سبب بهبود استخراج می‌شود. با این حال، در غلظت‌های بالاتر، به دلیل افزایش شدید ویسکوزیته و کاهش حجم آب آزاد در فاز پایین، حلالیت پروتئین‌ها کاهش می‌یابد و در نتیجه راندمان استخراج افت می‌کند. همان طور که در شکل ۳-ب مشخص است، بازده استخراج پروتئین برای دانه نیشی نسبت به خلر بالاتر بود. همچنین، استخراج با روش الف در هر دو نمونه به‌طور معناداری بازده بیشتری نسبت به روش ب داشت. بیشترین میزان استخراج برای هر دو نوع پروتئین نیشی و خلر در ترکیب حاوی ۲۰ درصد PEG و ۱ درصد صمغ عربی حاصل شد و این نتیجه در هر دو روش استخراج (الف و ب) تأیید گردید. شایان ذکر است که ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی صمغ عربی، به‌ویژه وزن مولکولی و توزیع آن، نقش تعیین کننده‌ای در رفتار سیستم‌های دو فاز ایفا می‌کند. وزن مولکولی صمغ عربی از جمله عواملی است که می‌تواند بر رفتار سیستم‌های دو فاز آبی تأثیرگذار باشد. تفاوت در وزن مولکولی، با تغییر در ویسکوزیته محیط، نحوه برهم کنش زنجیره‌های پلیمری با پروتئین‌ها و نیز میزان جدایش فازها، بر کارایی استخراج اثر مستقیم دارد. در مطالعه حاضر از صمغ عربی با وزن مولکولی متوسط حدود ۲۵۰ کیلو دالتون استفاده شد؛ بنابراین

یافته‌های به‌دست‌آمده باید در چارچوب این ویژگی خاص تفسیر شوند. بدیهی است که در صورت استفاده از صمغ‌هایی با وزن مولکولی متفاوت، ممکن است الگوهای استخراج و بازده به‌طور معناداری تغییر یابد، موضوعی که در پژوهش‌های پیشین نیز گزارش شده است (Garcia et al., 2018; Saravanan et al., 2008). در این شرایط، فاز غنی از PEG به‌طور مؤثری پروتئین را جذب کرده و فاز غنی از صمغ عربی به‌عنوان فاز مقابل عمل نمود. این روند با نتایج مطالعات پیشین هم‌راستا است؛ به‌طوری‌که Saravanan et al. (2008) نشان دادند PEG 4000 به‌طور عمده در فاز بالا تجمع یافته و جداسازی پروتئین‌ها در حضور pH بالا و غلظت کلرید سدیم بهبود می‌یابد. همچنین Iqbal et al. (2016) گزارش کردند که افزایش pH بالاتر از نقطه ایزوالکتریک، تمایل پروتئین‌ها به فاز غنی از PEG را تقویت می‌کند. یافته‌های Jiang et al. (2020) نیز حاکی از آن بود که آلفا-لاکتالبومین در سیستم PEG 1000 بیشتر به فاز بالا مهاجرت کرده و بازده استخراج آن برابر با ۸۷/۵۴ درصد به‌دست آمد. Zeng et al. (2013) نیز بالاترین بازده استخراج را تا میزان ۹۹/۶۲ درصد گزارش کردند. شکل ۴، شماتیک از سیستم‌های دو فاز آبی شامل پلی‌اتیلن گلیکول (با وزن مولکولی ۴۰۰۰ گرم بر مول) و صمغ عربی را برای استخراج و جداسازی پروتئین‌ها نمایش می‌دهد.



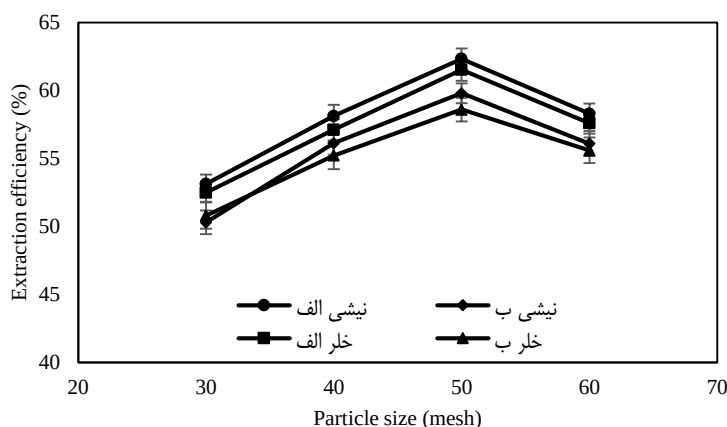
شکل ۳. الف) تأثیر غلظت پلی اتیلن گلیکول (PEG) و ب) صمغ عربی بر بازده استخراج



شکل ۴. شکل شماتیک سیستم دو فاز آبی حاوی پلی‌اتیلن گلیکول (PEG) و صمغ عربی

تأثیر اندازه ذرات بر راندمان استخراج ATPS

شکل ۵ تأثیر اندازه ذرات آرد (مش ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰) را بر راندمان استخراج پروتئین نشان می‌دهد. در این آزمایش، سایر شرایط از جمله غلظت ۲۰ درصد PEG، یک درصد صمغ عربی، نسبت جامد به مایع ۱:۱۰، و دمای ثابت ۲۵ °C، برای همه نمونه‌ها یکسان در نظر گرفته شد. با کاهش اندازه ذرات از مش ۳۰ به ۵۰، بازده استخراج به‌صورت پیوسته افزایش یافت. این افزایش را می‌توان به شکسته شدن ساختار سلول‌های گیاهی در طی فرایند آسیاب و به‌دنبال آن افزایش سطح تماس بین ذرات و حلال نسبت داد. در این شرایط، آزادسازی مؤثرتر ترکیبات درون‌سلولی رخ داده و استخراج پروتئین بهبود می‌یابد. با این حال، کاهش بیشتر اندازه ذرات از مش ۵۰ به ۶۰ منجر به کاهش بازده استخراج گردید. این کاهش ممکن است به دلیل بیش‌ازحد ریز بودن ذرات باشد که موجب تراکم و چسبندگی بین آن‌ها شده و در نتیجه، نفوذ مایع به درون ذرات و میان آن‌ها محدود گردد. این محدودیت نفوذ، ظرفیت انتقال جرم را کاهش داده و مانع از حل کامل و سریع پروتئین‌ها می‌شود (Mohseni et al., 2024). بر این اساس، اندازه ذره معادل مش ۵۰ به‌عنوان اندازه‌ی بهینه برای آرد نیشی و خلر در فرایند استخراج پروتئین با سیستم دو فاز آبی پیشنهاد می‌شود، چرا که تعادلی مناسب میان سطح تماس، نفوذپذیری و قابلیت آزادسازی پروتئین فراهم می‌آورد.



شکل ۵. تأثیر اندازه ذرات (مش) بر راندمان استخراج

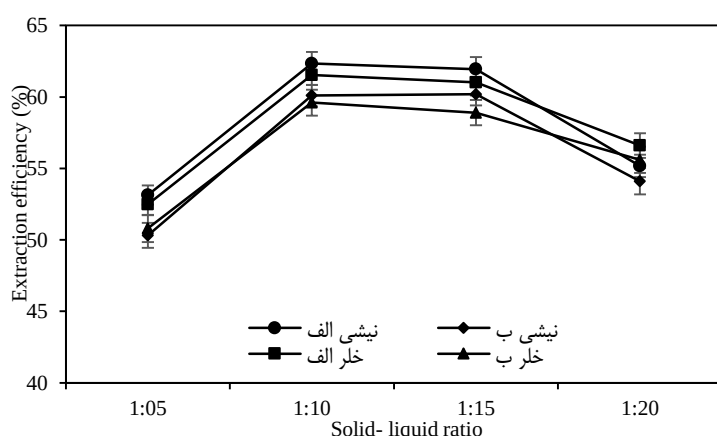
تأثیر نسبت جامد به مایع بر راندمان استخراج ATPS

شکل ۶ تأثیر نسبت جامد به مایع (نسبت آرد به حجم آب) را بر راندمان استخراج پروتئین در سیستم دو فاز آبی نشان می‌دهد. در این مطالعه، نسبت‌های مختلف ۱:۵، ۱:۱۰، ۱:۱۵ و ۱:۲۰ تحت شرایط ثابت شامل غلظت ۲۰ درصد PEG، یک درصد صمغ عربی، اندازه ذرات آرد با مش ۵۰ و دمای ۲۵ °C مورد ارزیابی قرار گرفتند. مطابق با نتایج به‌دست‌آمده و شکل ۶، با افزایش نسبت حلال از ۱:۵ به ۱:۱۰، بازده استخراج به‌طور قابل توجهی افزایش یافت. این افزایش را می‌توان به بهبود تماس بین ماده جامد و فاز مایع، افزایش نفوذپذیری و کاهش غلظت نسبی مواد حل‌شونده نسبت داد. با این حال، تغییر نسبت از ۱:۱۰ به ۱:۱۵ تفاوت معناداری در راندمان استخراج ایجاد نکرد، که نشان‌دهنده رسیدن سیستم به یک تعادل نسبی در شرایط استخراج بود. در ادامه، با افزایش نسبت جامد به مایع به ۱:۲۰، بازده استخراج کاهش یافت. این کاهش احتمالاً به دلیل رقیق شدن بیش از حد محیط استخراج و کاهش مؤثر تماس میان فازها رخ داده است، که در نهایت منجر به کاهش بهره‌وری انتقال جرم در سیستم می‌شود. بر این اساس، به‌نظر می‌رسد که ظرفیت استخراج سیستم‌های دو فاز آبی محدود بوده و هر ترکیب تنها در دامنه‌ای مشخص از نسبت جامد به مایع توانایی استخراج مؤثر ترکیبات هدف را دارد (Li et al., 2016). با در نظر گرفتن کارایی استخراج، صرفه‌جویی در مصرف حلال، و پایداری سیستم، نسبت ۱:۱۰ به‌عنوان نسبت بهینه جامد به مایع در این پژوهش پیشنهاد می‌گردد.

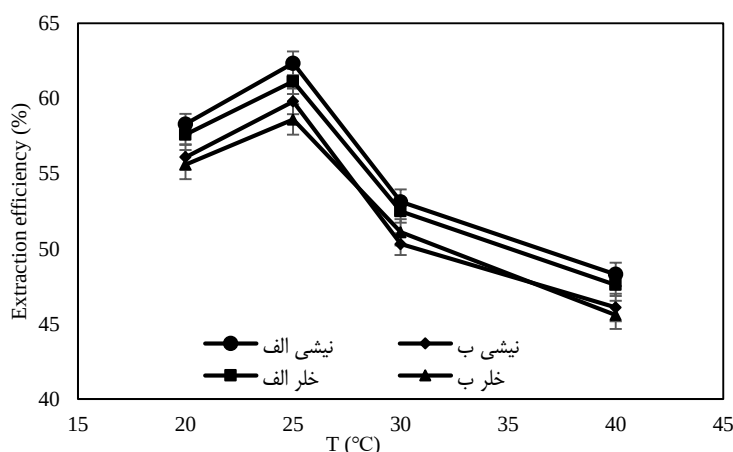
تأثیر دما بر راندمان استخراج ATPS

دما یکی از عوامل مهم و تأثیرگذار در استخراج و جداسازی مؤثر پروتئین‌ها به‌شمار می‌رود. به‌منظور بهینه‌سازی این پارامتر، فرایند استخراج در دماهای مختلف ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد. سایر شرایط از جمله غلظت ۲۰ درصد PEG، یک درصد صمغ عربی، اندازه ذرات آرد با مش ۵۰ و نسبت جامد به مایع ۱:۱۰ ثابت در نظر گرفته شدند. نتایج حاصل که در شکل ۷ ارائه شده‌اند، نشان دادند که

با افزایش دما از ۲۰ به ۲۵ درجه سلسیوس، بازده استخراج پروتئین به طور محسوسی افزایش یافت. این افزایش را می توان به کاهش ویسکوزیته سیستم، بهبود تحرک مولکولی و افزایش ضریب نفوذ نسبت داد. با این حال، افزایش بیشتر دما از ۳۰ درجه سلسیوس، منجر به کاهش راندمان استخراج گردید. این کاهش می تواند به تغییرات ساختاری در پلیمر PEG در دماهای بالا نسبت داده شود که باعث کاهش برهم کنش های ترجیحی بین پلیمر و پروتئین می شود. علاوه بر این، دمای بالا احتمال دناتوره شدن ساختار طبیعی پروتئین ها را افزایش داده و در نتیجه باعث کاهش بازده استخراج می گردد (Saravanan et al., 2008; Zeng et al., 2013). Li et al. (2016) نیز در مطالعه ای بر استخراج آلبومین سرم گاوی مشاهده کردند که در دماهای کمتر از ۳۰ °C، بازده استخراج به دلیل کاهش ویسکوزیته حلال و افزایش ضریب نفوذ به طور قابل توجهی افزایش می یابد. اما با افزایش دما، به ویژه در دمای ۵۰ °C، بازده استخراج به شدت کاهش می یابد. علت این پدیده، احتمالاً تخریب برهم کنش های هیدروژنی میان باقی مانده های اسید آمینه و مولکول های آب سطحی پروتئین و نیز دناتوره شدن ساختار پروتئین در دمای بالا عنوان شده است. بر اساس این نتایج و با توجه به نمودار ارائه شده در شکل ۷، دمای ۲۵ °C به عنوان دمای بهینه برای استخراج پروتئین در سیستم دو فاز آبی PEG-صمغ عربی تعیین شد.



شکل ۶. تأثیر نسبت جامد به مایع بر راندمان استخراج

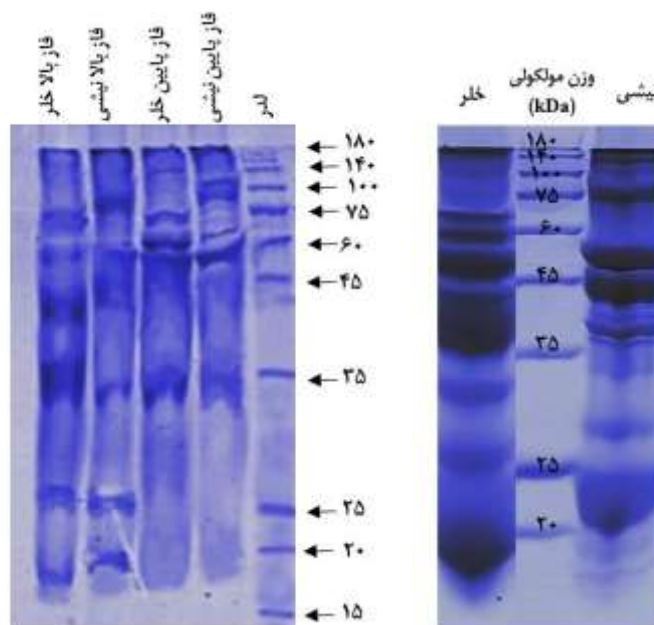


شکل ۷. تأثیر دما بر راندمان استخراج

الگوی ژل الکتروفورز SDS-PAGE

شکل ۸، الگوهای الکتروفورز نمونه هایی را نمایش می دهد که در شرایط بهینه شامل ۲۰ درصد PEG، یک درصد صمغ عربی، نسبت جامد به مایع ۱:۱۰، اندازه ذرات مش ۵۰، دمای ۲۵ °C و استفاده از روش استخراج الف، و با بیشترین بازده استخراج، تهیه شده اند. بر اساس نتایج حاصل از شکل ۸-الف، باندهای مشاهده شده در نمونه نیشی در محدوده وزن مولکولی ۱۹ تا ۱۲۰ کیلو دالتون قرار داشتند که شامل زیرواحدهای عمده در حدود ۱۹، ۲۴، ۳۶، ۴۰، ۵۰، ۷۵ و ۱۲۰ کیلو دالتون بود. برای نمونه خلر نیز باندهایی در محدوده ۱۸ تا ۱۴۰ کیلو دالتون مشاهده شد که زیرواحدهای اصلی آن شامل وزن های حدود ۱۸، ۲۶، ۳۵، ۴۰، ۵۰، ۶۲، ۷۰ و ۱۴۰ کیلو دالتون بودند. این نتایج با

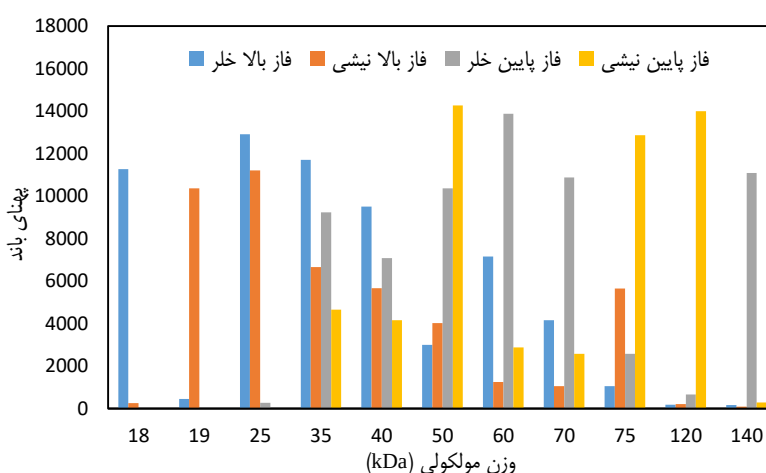
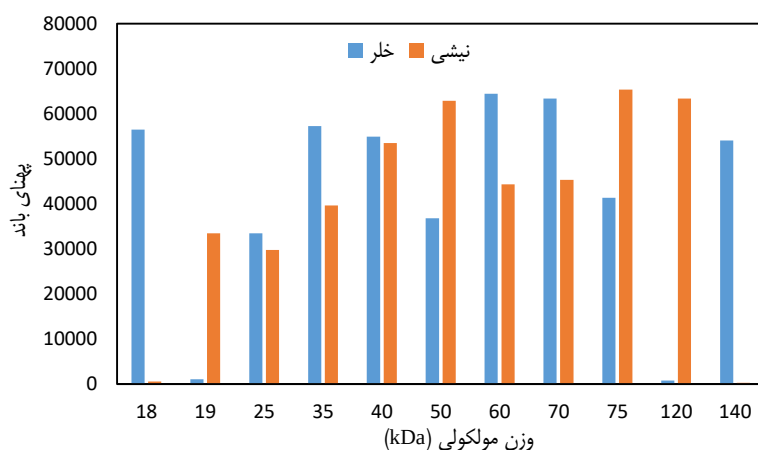
یافته‌های Shevkani et al. (2015) هم‌راستا است که زیرواحدهای پلی‌پپتیدی با وزن مولکولی بین ۱۷ تا ۹۳ کیلو دالتون را در جدایه‌ی لوبیای قرمز گزارش کردند. شکل ۸-ب نشان می‌دهد که در فاز بالای سیستم دو فاز آبی، زیرواحدهای غالب برای پروتئین نیشی دارای وزن مولکولی در حدود ۱۹، ۲۴، ۳۵ و ۴۰ کیلو دالتون و برای پروتئین خلر دارای وزن‌های حدود ۱۸، ۲۶، ۳۵ و ۴۰ کیلو دالتون بودند. در مقابل، در فاز پایینی، زیرواحدهای غالب در نمونه نیشی شامل وزن‌های ۳۵، ۵۰، ۶۳، ۷۵ و ۱۲۰ کیلو دالتون و در نمونه خلر شامل ۳۵، ۵۰، ۶۲، ۷۰ و ۱۴۰ کیلو دالتون بودند. بر اساس این الگوها، می‌توان نتیجه گرفت که پلی‌پپتیدهای با وزن مولکولی پایین‌تر (کمتر از ۲۵ کیلو دالتون) تمایل بیشتری به مهاجرت به فاز بالایی داشته‌اند. این تفاوت رفتاری را می‌توان به تفاوت در زنجیره‌های جانبی این پروتئین‌ها نسبت داد؛ به‌طوری که پروتئین‌های سبک‌تر دارای زنجیره‌های جانبی کوتاه‌تر و در نتیجه آبدوستی بیشتر هستند و تمایل بیشتری به فاز غنی از PEG دارند. در حالی که پروتئین‌های با وزن مولکولی بالا به دلیل زنجیره‌های جانبی بلندتر، آبدوستی کمتری دارند و در فاز غنی از صمغ عربی تجمع می‌یابند. لازم به ذکر است که ساختار دوگانه‌دوستی پروتئین‌ها، در کنار ویژگی‌های آب‌دوستی پلیمرهای مورد استفاده، تعیین‌کننده‌ی رفتار پارتیشن‌بندی در این سیستم‌ها است. علاوه بر وزن مولکولی، بار الکتریکی سطحی پروتئین‌ها نیز عامل مهمی در مهاجرت آن‌ها بین فازها محسوب می‌شود. برهم‌کنش‌های الکترواستاتیک بین باقی‌مانده‌های باردار اسیدهای آمینه سطح پروتئین و پلیمرهای فازي نیز نقش کلیدی در رفتار استخراج دارند. با این حال، درک دقیق از نیروهای محرکه‌ی درگیر در تقسیم پروتئین‌ها بین دو فاز همچنان به‌طور کامل حاصل نشده است (S. Dreyer et al., 2009).



شکل ۸. الگوی الکتروفورز (SDS-PAGE) پروتئین‌ها. الف) استخراج در آب مقطر؛ ب) استخراج و خالص‌سازی در شرایط بهینه سیستم دو فازي آبی

به‌منظور بررسی دقیق‌تر نحوه‌ی توزیع فراکسیون‌های پروتئینی، نمودار شکل ۹ تهیه شد که در آن، میزان حضور پلی‌پپتیدها با وزن‌های مولکولی مختلف در فازهای جدا شده به‌صورت مجزا نمایش داده شده است. مطابق با یافته‌های پیشین، پلی‌پپتیدهای با وزن مولکولی پایین عمدتاً به فاز بالا و پلی‌پپتیدهای با وزن بالاتر به فاز پایین مهاجرت کردند. با این حال، پلی‌پپتیدهای با وزن مولکولی متوسط (در محدوده ۳۵ تا ۶۰ کیلو دالتون) در هر دو فاز بالا و پایین پراکنده بودند. به‌نظر می‌رسد که در این دسته از پلی‌پپتیدها، تغییرات ساختاری زنجیره‌های جانبی در طی فرآیند استخراج موجب کاهش آبدوستی و در نتیجه تقسیم نسبی آن‌ها میان فازها شده است. پارتیشن‌بندی واقعی پروتئین‌ها، که مستقل از غلظت کلی پروتئین بوده و تنها در شرایط غلظت پایین اتفاق می‌افتد، تحت تأثیر عواملی چون وزن مولکولی، بار سطحی، آبدوستی، و برهم‌کنش‌های الکترواستاتیکی بین پلیمرها و پروتئین‌ها قرار دارد. در غلظت‌های بالاتر پروتئین، معمولاً تجمع و رسوب در ناحیه‌ی بین دو فاز مشاهده می‌شود که با پروتئین‌های حل شده در هر فاز در تعادل قرار دارد. اگرچه روند مشخصی از تأثیر وزن مولکولی بر پارتیشن‌بندی یافت نشد، اما در سیستم‌های دکستران-PEG، تمایل پروتئین‌های با وزن بالاتر به تقسیم در فاز پایینی (غنی از PEG) گزارش شده است (Asenjo & Andrews, 2011). مطالعه‌ی Li et al. (2016) نشان داد که پس از استخراج خون گوساله با

سیستم ATPS، آلومین سرم (۶۶ کیلو دالتون) عمدتاً در فاز بالایی غنی از حلال یوتکتیک مبتنی بر بتائین یافت شد. همچنین باندهایی با وزن ۱۵ و ۲۸ کیلو دالتون نیز در این فاز مشاهده شد، در حالی که فاز پایین فاقد باندهای قابل تشخیص بود. در مطالعه دیگری، Xin- (2012) Ying et al. توزیع پروتئین‌های با فراوانی بالا در سرم انسانی را در دو فاز PEG و نمک بررسی کردند و مشاهده شد که فاز پایین دارای محتوای پروتئینی بیشتری است و وجود آلومین انسانی (۵۶ کیلو دالتون) در این فاز تأیید گردید. در مطالعه‌ی S. Dreyer et al. (2009) الگوهای الکتروفورز نمونه‌های پروتئینی استخراج‌شده از فاز بالایی سیستم دو فاز آبی مبتنی بر محلول‌های یونی ارائه شد. زیرواحدهای پلی‌پپتیدی با وزن مولکولی در حدود ۳۸-۴۴ و ۱۹-۲۹ کیلو دالتون، به احتمال زیاد به ترتیب به زیرواحدهای اسیدی و بازی گلیسین، یکی از اجزای اصلی پروتئین‌های لگومین، نسبت داده می‌شوند (Ruan et al., 2020; Shevkani et al., 2015; Sirtori et al., 2012). Isak, (2012) افزون بر این، زیرواحدهای پلی‌پپتیدی با وزن تقریبی ۵۰ و ۷۰ کیلو دالتون به ترتیب قابل انتساب به ویسلین و کنویسلین هستند که از اجزای عمده پروتئین‌های ذخیره‌ای در دانه‌های بقولات محسوب می‌شوند (Shevkani et al., 2015). Singh and Kaur (2019) گزارش کردند که پلی‌پپتیدها با وزن مولکولی در محدوده ۱۲ تا ۱۲۰ کیلو دالتون و ۵/۱۱ تا ۱۲۲ کیلو دالتون، به ترتیب با بخش‌های آلومین و گلوبولین (پروتئین‌های محلول در نمک) مطابقت دارند. در اغلب سیستم‌های PEG-نمک، مشاهده شده است که پروتئین ذرت تمایل به مهاجرت به فاز پایینی دارد. این مطالعات تأکید دارند که سیستم‌های دو فاز آبی (ATPS) قابلیت ادغام مراحل استخراج و جداسازی را در یک فرآیند واحد فراهم می‌کنند (Gu & Glatz, 2007).



شکل ۹. مقادیر پلی‌پپتیدهای ژل الکتروفورز (SDS-PAGE) به دست آمده با استفاده از برنامه J image. الف) استخراج در آب مقطر؛ ب) استخراج و خالص‌سازی در شرایط بهینه سیستم دو فاز آبی

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

در این مطالعه، قابلیت استخراج پروتئین از دانه‌های گیاهی خلر (*Lathyrus sativus*) و نیسی (*Lathyrus rotundifolius*) در pH ها و

غلظت‌های مختلف نمک کلرید سدیم (NaCl) و همچنین با استفاده از سیستم‌های دو فاز آبی (ATPS) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که کمترین قابلیت استخراج پروتئین در هر دو نمونه در آب مقطر و در pH حدود ۴ (نقطه ایزوالکتریک) مشاهده شد. افزودن نمک (۰/۲ و ۰/۶ مولار) نیز تغییری در این روند ایجاد نکرد و کمترین استخراج همچنان در pH ۴ باقی ماند، در حالی که در غلظت ۱ مولار نمک، حداقل استخراج به pH برابر ۲/۵ منتقل شد. بیشترین مقدار پروتئین استخراج‌شده در آب مقطر، به ترتیب برابر با $12/38 \pm 0/39$ و $12/88 \pm 0/13$ میلی گرم در میلی لیتر برای خلر و نیسی به دست آمد. در محلول‌های نمکی، بیشترین استخراج در pH برابر ۸/۵ و غلظت ۱ مولار نمک حاصل شد، اما همچنان مقادیر به دست آمده از آب مقطر بیشتر بود. در مجموع، استفاده از محلول‌های نمکی موجب بهبود معناداری در بازده استخراج نسبت به آب مقطر نشد. در ادامه، سیستم دو فاز آبی مبتنی بر پلی اتیلن گلیکول (PEG 4000) و صمغ عربی طراحی و به کار گرفته شد. نتایج نشان داد که PEG و صمغ عربی به ترتیب در فازهای بالا و پایین تجمع یافتند و سیستم توانست راندمانی در حدود ۶۳ درصد برای استخراج پروتئین از دانه‌های خلر و نیسی ارائه دهد. شرایط بهینه شامل ۲۰ درصد PEG، یک درصد صمغ عربی، اندازه ذرات مش ۵۰، نسبت جامد به مایع ۱:۱۰ و دمای 25°C بود. پروفایل‌های الکتروفورز (SDS-PAGE) نشان دادند که زیرواحدهای پلی پپتیدی با وزن مولکولی پایین‌تر (کمتر از ۲۵ کیلو دالتون) عمدتاً به فاز بالایی و زیرواحدهای با وزن بالاتر (بیش از ۵۰ کیلو دالتون) به فاز پایینی مهاجرت کردند. الگوهای الکتروفورز برای خلر شامل باندهایی در محدوده ۱۸ تا ۱۴۰ کیلو دالتون و برای نیسی در محدوده ۱۹ تا ۱۲۰ کیلو دالتون بود که تنوع مناسبی از پروتئین‌ها را نشان می‌دهد. این نتایج نشان داد که سیستم‌های دو فاز آبی مبتنی بر PEG- صمغ عربی می‌توانند به عنوان روشی سریع، سبز، کارآمد و زیست‌سازگار برای استخراج و جداسازی ترکیبات زیست‌فعال از جمله پروتئین‌ها مورد استفاده قرار گیرند.

با توجه به یافته‌های این پژوهش، پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده از ترکیب‌های پلیمری زیست‌سازگار بیشتری از جمله پلیمرهای طبیعی مانند اینولین یا پکتین برای بهبود زیست‌پذیری سیستم استفاده شود. همچنین بررسی تأثیر نوع و غلظت نمک‌های مختلف نظیر فسفات‌ها یا سولفات‌ها بر رفتار استخراج می‌تواند مفید باشد. آنالیز ساختاری و عملکردی دقیق‌تر پروتئین‌های استخراج‌شده، از جمله ارزیابی فعالیت بیولوژیکی و پایداری حرارتی، برای کاربرد در صنایع غذایی و دارویی توصیه می‌شود. علاوه بر این، توسعه فرآیند مقیاس‌پذیر برای استفاده صنعتی از این روش و ادغام آن با فناوری‌های غشایی مانند اولترافیلتراسیون، می‌تواند منجر به افزایش خلوص و کارایی جداسازی گردد. تحلیل اقتصادی و ارزیابی چرخه عمر این فناوری نسبت به روش‌های متداول نیز می‌تواند در تعیین پایداری و مقرون به صرفه بودن آن در مقیاس صنعتی نقش مؤثری ایفا کند.

منابع

سبوحی، فائزه (۱۳۹۱). بررسی تئوری و تجربی استخراج پروتئین آلبومین به وسیله سیستم‌های دوفازی شامل پلی اتیلن گلیکول. پایان نامه کارشناسی ارشد. به راهنمایی علیرضا صلابت و مشاوره محمد سلیمانزاد. ارک: دانشگاه اراک، دانشکده علوم پایه.

همایونفال، مینا (۱۳۹۷). مدلسازی استخراج ترکیبات آنتوسیانینی از زرشک و رهایش کنترل شده آنتوسیانین‌های پوشینه‌دار شده. رساله دکتری. به راهنمایی محمدعلی ابراهیمزاده موسوی و مشاوره حسین کیانی، غلامرضا عسگری. کرج: دانشگاه تهران، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی.

REFERENCES

- Achouri, A., Nail, V., & Boye, J. I. (2012). Sesame protein isolate: Fractionation, secondary structure and functional properties. *Food research international*, 46(1), 360-369. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.01.001>
- Asenjo, J. A., & Andrews, B. A. (2011). Aqueous two-phase systems for protein separation: a perspective. *Journal of Chromatography A*, 1218(49), 8826-8835.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Chao, Y., & Shum, H. C. (2020). Emerging aqueous two-phase systems: from fundamentals of interfaces to biomedical applications. *Chemical Society Reviews*, 49(1), 114-142.
- Chethana, S., Rastogi, N., & Raghavarao, K. (2006). New aqueous two phase system comprising polyethylene glycol and xanthan. *Biotechnology letters*, 28(1), 25-28.
- de Barros, D. P., Campos, S. R., Madeira, P. P., Azevedo, A. M., Baptista, A. M., & Aires-Barros, M. R. (2014). Modeling the partitioning of amino acids in aqueous two phase systems. *Journal of Chromatography A*, 1329, 52-60.



- Deng, Y., Huang, L., Zhang, C., Xie, P., Cheng, J., Wang, X., & Li, S. (2019). Physicochemical and functional properties of Chinese quince seed protein isolate. *Food chemistry*, 283, 539-548. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.083>
- Domínguez-Puerto, R., Valle-Guadarrama, S., Guerra-Ramírez, D., & Hahn-Schlam, F. (2018). Purification and concentration of cheese whey proteins through aqueous two phase extraction. *CyTA-Journal of Food*, 16(1), 452-459.
- Dreyer, S., Salim, P., & Kragl, U. (2009). Driving forces of protein partitioning in an ionic liquid-based aqueous two-phase system. *Biochemical Engineering Journal*, 46(2), 176-185. doi:<http://doi.org/10.1016/j.bej.2009.05.005>
- Dreyer, S. E. (2008). Aqueous two-phase extraction of proteins and enzymes using tetraalkylammonium-based ionic liquids. *Universität Rostock*.
- Eromosele, C., Arogundade, L., Eromosele, I., & Ademuyiwa, O. (2008). Extractability of African yam bean (*Sphenostylis stenocarpa*) protein in acid, salt and alkaline aqueous media. *Food hydrocolloids*, 22(8), 1622-1628.
- Feyzi, S., Milani, E., & Golimovahhed, Q. A. (2018). Grass pea (*Lathyrus sativus* L.) protein isolate: The effect of extraction optimization and drying methods on the structure and functional properties. *Food hydrocolloids*, 74, 187-196. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.07.031>
- Feyzi, S., Varidi, M., Zare, F., & Varidi, M. J. (2017). A comparison of chemical, structural and functional properties of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) protein isolates produced using different defatting solvents. *International journal of biological macromolecules*, 105, 27-35. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.06.101>
- Freire, L. A., & Pereira, C. G. (2019). Evaluation of α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin goat milk whey protein partition by aqueous two-phase systems using polymer/maltodextrin. *Journal of Environment & Biotechnology Research*, 8(3), 29-27.
- Garcia, E. S., Ruiz, C. A. S., Tilaye, T., Eppink, M. H., Wijffels, R. H., & van den Berg, C. (2018). Fractionation of proteins and carbohydrates from crude microalgae extracts using an ionic liquid based-aqueous two phase system. *Separation and Purification Technology*, 204, 56-65.
- Gerzhova, A., Mondor, M., Benali, M., & Aider, M. (2016). Study of total dry matter and protein extraction from canola meal as affected by the pH, salt addition and use of zeta-potential/turbidimetry analysis to optimize the extraction conditions. *Food chemistry*, 201, 243-252.
- Gu, Z., & Glatz, C. E. (2007). Aqueous two-phase extraction for protein recovery from corn extracts. *Journal of Chromatography B*, 845(1), 38-50.
- Gundogan, R., & Karaca, A. C. (2020). Physicochemical and functional properties of proteins isolated from local beans of Turkey. *LWT*, 109609. doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109609>
- Hadnadev, M. S., Hadnadev-Dapčević, T., Pojić, M. M., Šarić, B. M., Mišan, A. Č., Jovanov, P. T., & Sakač, M. B. (2017). Progress in vegetable proteins isolation techniques: A review. *Food and Feed Research*, 44(1), 11-21.
- Homayoonfal, M., Mousavi, S.M.A., Kiani, H., Askari, G. (2018). *Modelling the extraction of Berberis Vulgaris anthocyanin compounds and controlled release of encapsulated anthocyanins* (Doctoral dissertation). Department of Food Science and Engineering, Faculty of Agricultural Engineering and Technology, University of Tehran. (In Persian).
- Intl, A. (1995). Official methods of analysis of AOAC International. Arlington, Va.: AOAC Intl. pv (loose-leaf).
- Iqbal, M., Tao, Y., Xie, S., Zhu, Y., Chen, D., Wang, X., . . . Shabbir, M. A. B. (2016). Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications. *Biological procedures online*, 18(1), 18.
- Jiang, B., Wang, L., Na, J., Zhang, X., Yuan, Y., Liu, C., & Feng, Z. (2020). Environmentally-friendly strategy for separation of α -lactalbumin from whey by aqueous two phase flotation. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(1), 3391-3402.
- Jyothirmayi, T., Rao, P. P., & Walde, S. (2006). Nitrogen extractability and functional properties of defatted *Erythrina variegata* flour. *Food chemistry*, 96(2), 242-247.
- Khan, B. M., Cheong, K.-L., & Liu, Y. (2019). ATPS: "Aqueous two-phase system" as the "answer to protein separation" for protein-processing food industry. *Critical reviews in food science and nutrition*, 59(19), 3165-3178.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227(5259), 680-685.

- Li, N., Wang, Y., Xu, K., Huang, Y., Wen, Q., & Ding, X. (2016). Development of green betaine-based deep eutectic solvent aqueous two-phase system for the extraction of protein. *Talanta*, 152, 23-32. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2016.01.042>
- Ma, M., Ren, Y., Xie, W., Zhou, D., Tang, S., Kuang, M., . . . Du, S.-k. (2018). Physicochemical and functional properties of protein isolate obtained from cottonseed meal. *Food chemistry*, 240, 856-862. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.030>
- Mehr, H. M., & Koocheki, A. (2021). Physicochemical properties of Grass pea (*Lathyrus sativus* L.) protein nanoparticles fabricated by cold atmospheric-pressure plasma. *Food hydrocolloids*, 112, 106328. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106328>
- Mohseni, M., Mousavi, S. M., Kiani, H., & Homayoonfal, M. (2024). Microwave-assisted aqueous two-phase extraction of l-Citrulline from watermelon rind: optimization, antioxidant potential, and microstructural insight. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 1-16. doi:<https://doi.org/10.1007/s11694-024-02936-6>
- Pastor-Cavada, E., Juan, R., Pastor, J. E., Alaiz, M., & Vioque, J. (2009). Antioxidant activity of seed polyphenols in fifteen wild *Lathyrus* species from South Spain. *LWT-Food Science and Technology*, 42(3), 705-709.
- Peters, T. J. C. B., biochemistry, F. C., & disease, i. m. b. a. a. o. (1987). Partition of cell particles and macromolecules: Separation and purification of biomolecules, cell organelles, membranes and cells in aqueous polymer two phase systems and their use in biochemical analysis and biotechnology. P-A. Albertsson. 1986, John Wiley and Sons, Chichester, £ 61.35 pages 346. 5(3), 233-234.
- Platis, D., & Labrou, N. E. (2006). Development of an aqueous two-phase partitioning system for fractionating therapeutic proteins from tobacco extract. *Journal of Chromatography A*, 1128(1-2), 114-124.
- Pojić, M., Mišan, A., & Tiwari, B. (2018). Eco-innovative technologies for extraction of proteins for human consumption from renewable protein sources of plant origin. *Trends in food science & technology*, 75, 93-104. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.010>
- Qayyum, M., Butt, M., Anjum, F., & Nawaz, H. (2012). Composition analysis of some selected legumes for protein isolates recovery. *The Journal of Animal and Plant Sciences*, 22(4), 1156-1162.
- Romano, A., Giosafatto, C., Al-Asmar, A., Masi, P., Aponte, M., & Mariniello, L. (2019). Grass pea (*Lathyrus sativus*) flour: microstructure, physico-chemical properties and in vitro digestion. *European Food Research and Technology*, 245(1), 191-198.
- Ruan, S., Li, Y., Wang, Y., Huang, S., Luo, J., & Ma, H. (2020). Analysis in protein profile, antioxidant activity and structure-activity relationship based on ultrasound-assisted liquid-state fermentation of soybean meal with *Bacillus subtilis*. *Ultrasonics sonochemistry*, 64, 104846. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104846>
- Sara, A. S., Mathé, C., Basselin, M., Fournier, F., Aymes, A., Bianeis, M., . . . Kapel, R. (2020). Optimization of sunflower albumin extraction from oleaginous meal and characterization of their structure and properties. *Food hydrocolloids*, 99, 105335.
- Saravanan, S., Rao, J. R., Nair, B. U., & Ramasami, T. (2008). Aqueous two-phase poly (ethylene glycol)-poly (acrylic acid) system for protein partitioning: Influence of molecular weight, pH and temperature. *Process biochemistry*, 43(9), 905-911.
- Saravanan, S., Reena, J. A., Rao, J. R., Murugesan, T., & Nair, B. U. (2006). Phase equilibrium compositions, densities, and viscosities of aqueous two-phase poly (ethylene glycol)+ poly (acrylic acid) system at various temperatures. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 51(4), 1246-1249.
- Shevkani, K., Singh, N., Chen, Y., Kaur, A., & Yu, L. (2019). Pulse proteins: Secondary structure, functionality and applications. *Journal of Food Science and Technology*, 56(6), 2787-2798. doi:<https://doi.org/10.1007/s13197-019-03723-8>
- Shevkani, K., Singh, N., Kaur, A., & Rana, J. C. (2015). Structural and functional characterization of kidney bean and field pea protein isolates: a comparative study. *Food hydrocolloids*, 43, 679-689. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.07.024>
- Singh, A., & Kaur, A. (2019). Comparative studies on seed protein characteristics in eight lines of two *Gossypium* species. *Journal of Cotton Research*, 2(1), 6. doi:<https://doi.org/10.1186/s42397-019-0024-3>
- Sirtori, E., Isak, I., Resta, D., Boschini, G., & Arnoldi, A. (2012). Mechanical and thermal processing effects on protein integrity and peptide fingerprint of pea protein isolate. *Food chemistry*, 134(1), 113-121.



- Sobbuhi, F., Salabat, A., Solimannejad, M. (2012). *Experimental and theoretical investigation of bovine Albumin extraction using aqueous two phase systems composed of PEG* (Doctoral dissertation). Department of Chemistry, Faculty of Sciences, ArakUniversity, Arak. (In Persian).
- Tirgar, M., Silcock, P., Carne, A., & Birch, E. J. (2017). Effect of extraction method on functional properties of flaxseed protein concentrates. *Food chemistry*, 215, 417-424. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.002>
- Uversky, V. N., Madeira, P. P., & Zaslavsky, B. Y. (2024). What Can Be Learned from the Partitioning Behavior of Proteins in Aqueous Two-Phase Systems? *International Journal of Molecular Sciences*, 25(12), 6339.
- Vicente, F. A., Santos, J. H., Pereira, I. M., Gonçalves, C. V., Dias, A. C., Coutinho, J. A., & Ventura, S. P. (2019). Integration of aqueous (micellar) two-phase systems on the proteins separation. *BMC Chemical Engineering*, 1(1), 4.
- Wang, M., Jiang, L., Li, Y., Liu, Q., Wang, S., & Sui, X. (2011). Optimization of extraction process of protein isolate from mung bean. *Procedia Engineering*, 15, 5250-5258.
- Xin-Ying, Z., Feng, Q., Min, D., Fan, C., Ai-Qin, L., & ZHANG, J.-H. (2012). Separation of proteins by aqueous two-phase extraction system combined with liquid chromatography. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 40(1), 38-42.
- Yang, L., Huo, D., Hou, C., He, K., Lv, F., Fa, H., & Luo, X. (2010). Purification of plant-esterase in PEG1000/NaH₂PO₄ aqueous two-phase system by a two-step extraction. *Process biochemistry*, 45(10), 1664-1671.
- Youshanlouei, Y. A., Kiani, H., Mousavi, M., & Mousavi, Z. E. (2022). Grass pea (*Lathyrus sativus* L.) protein yield and functionality as affected by extraction method: Alkaline, ultrasound-assisted, and ultrasound pretreatment extraction. *Cereal Chemistry*. doi:<https://doi.org/10.1002/cche.10549>
- Youshanlouei, Y. A., Kiani, H., Mousavi, M., Mousavi, Z. E., Tao, Y., & Halim, R. (2024). Persian everlasting pea (*Lathyrus rotundifolius* L.) protein isolate as a potential protein source for food application: Effect of ultrasound-assisted extraction method on the properties of the protein isolates. *Journal of Food Process Engineering*, 47(1), e14533. doi:<https://doi.org/10.1111/jfpe.14533>
- Zayas, J. F. (1997). Solubility of proteins. In *Functionality of proteins in food* (pp. 6-75): Springer.
- Zeng, Q., Wang, Y., Li, N., Huang, X., Ding, X., Lin, X., . . . Liu, X. (2013). Extraction of proteins with ionic liquid aqueous two-phase system based on guanidine ionic liquid. *Talanta*, 116, 409-416.
- ZHANG, H., JIANG, B., Zhi-Biao, F., Yu-Xiao, Q., & Xuan, L. (2016). Separation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in whey protein isolate by aqueous two-phase system of polymer/phosphate. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 44(5), 754-759.