

# بهینه‌سازی تولید ایزوله پروتئینی رسوبی از کنجاله‌های هگزانی و دوفازی کانولا

علیرضا قدس ولی\*<sup>۱</sup>، منوچهر وثوقی<sup>۲</sup>، محمد حسین حداد خداپرست<sup>۳</sup>، فخری شهیدی<sup>۴</sup>

۱- عضو هیئت علمی (پژوهشیار) مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی گلستان.

۲- استاد گروه مهندسی شیمی دانشگاه صنعتی شریف.

۳- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد.

۴- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد.

## چکیده

در این تحقیق تأثیر وارسته و روش استخراج روغن روی ترکیبات شیمیایی (پروتئین، گلوکوزینولات و اسید فیتیک) کنجاله‌های تک‌فازی (استخراج روغن بوسیله هگزان) و دوفازی (استخراج روغن توسط متانول-آب و هگزان) ارقام کانولای ایران (*Brassica napus*) شامل کوانتوم، پی.اف.۷۰۴۵/۹۱ و هایولا ۴۰۱ بررسی گردید. شرایط بهینه استخراج پروتئین و اسید فیتیک و نیز قابلیت ترسیب پروتئین کنجاله‌های آزمایشگاهی، مورد آزمایش قرار گرفت. تأثیر روش استخراج روی پروتئین، گلوکوزینولات و اسید فیتیک محتوی تعیین گردید. استخراج قلبایی در pH بین ۹/۵ و ۱۲/۰ و ترسیب ایزوالکتریک در pH بین ۳/۵ و ۷/۵ با گام ۰/۵ واحد آزمون شد. تأثیر رقم و روش استخراج روغن بر پروتئین و گلوکوزینولات محتوی معنی‌دار ( $P > 0.01$ ) بود، چنانکه روش دوفازی منجر به افزایش حدود ۱۵-۱۰ درصد در میزان پروتئین و کاهش حدود ۵۰ درصد در میزان گلوکوزینولات گردید. اسید فیتیک محتوی کنجاله‌ها تحت تأثیر رقم و روش استخراج نبود و اختلاف معنی‌دار ( $P > 0.05$ ) مشاهده نشد. pH بهینه استخراج پروتئین برای تمامی تیمارها، ۱۲/۰ بود. روش استخراج روغن دارای تأثیر معنی‌دار ( $P > 0.01$ ) روی حلالیت نیتروژن بود. بیشترین راندمان استخراج پروتئین در این تحقیق، ۶۰/۷ درصد و مربوط به کنجاله هگزانی وارسته پی.اف. بود. قابلیت استخراج اسید فیتیک در pH بین ۱۲-۱۱/۵ (پی.اف. هگزانی) و ۱۶/۲ (هایولا هگزانی و دوفازی) مشاهده شد. تأثیر pH بر میزان ترسیب پروتئین استخراج شده در محلول قلبایی بسیار معنی‌دار ( $P > 0.01$ ) بود. pH بهینه ترسیب برای تمامی کنجاله‌های آزمایشگاهی در دامنه تقریباً وسیعی (بین ۵/۵ تا ۵/۵) قرار داشت که بیش از ۵۰ درصد از پروتئین‌های استخراج شده، به صورت رسوب بازیافت گردید. حدود ۶۰ درصد از پروتئین موجود در هر دو نوع کنجاله به صورت دو محصول قابل استفاده شامل پسمان کنجاله و ایزوله پروتئینی رسوبی، جدا گردید. بیشینه راندمان بازیافت پروتئین رسوبی برای کنجاله هگزانی ۱۵/۴ درصد (رقم پی.اف) و برای کنجاله دوفازی ۱۰/۵ درصد (رقم کوانتوم) بود. ایزوله‌های پروتئینی رسوبی فاقد گلوکوزینولات و حاوی مقادیر کم گلوکوزینولات، اسید فیتیک بودند.

**واژه‌های کلیدی:** کلزا/ کانولا، استخراج دوفازی، استخراج قلبایی، ترسیب ایزوالکتریک، پروتئین رسوبی، گلوکوزینولات، اسید فیتیک.

\* مسئول مکاتبات مقاله: E-mail: [qodsevali@yahoo.com](mailto:qodsevali@yahoo.com)

## ۱- مقدمه

کلزا/کانولا یکی از دانه‌های روغنی مهم است که از نظر تولید جهانی مقام دوم را به خود اختصاص داده و در حال حاضر تولید جهانی آن متجاوز از ۴۰ میلیون تن در سال می باشد [۲۹]، چین و کانادا به ترتیب به عنوان بزرگترین تولید کننده و صادر کننده شناخته شده‌اند. کانادا پیشگام و راهبر در تولید انبوه واریته‌های مدرن و تراریخته است. واریته‌های جدید دارای کیفیتی بالا و حاوی مقادیر بسیار پایین اسید اروسیک (کمتر از ۲ درصد) و گلوکوزینولات (کمتر از ۳۰ میکرومول در گرم کنجاله) می باشند. ارقام جدید کلزا که ارقام دو صفر و یا کانولا نامیده می‌شوند، توسط متخصصین اصلاح نژاد نه تنها برای تولید روغن خوراکی بلکه برای تولید کنجاله‌ای که منبعی پروتئینی محسوب شده و می‌تواند هم در خوراک دام و هم در مصارف انسانی کاربرد داشته باشد، اصلاح ژنتیکی شده و نهایتاً معرفی شده‌اند.

کانولا یک دانه روغنی جدید در ایران محسوب می‌گردد، و به طور حتم در مراحل اولیه، کشت آن به دلیل ناشناخته بودن مسائل مربوط به آفات و امراض، بیماری‌ها و سایر موارد مشابه با مشکلاتی همراه خواهد بود. اکثر این مشکلات می‌تواند از طریق اعمال مدیریت صحیح و ادامه کسب تجربه در کشت آن حذف شده و یا به حداقل ممکن برسد. بیش از ۹۰ درصد از روغن خوراکی مصرفی کشور از طریق تخصیص منابع ارزی و واردات تأمین می‌گردد، لذا توسعه کشت دانه‌های روغنی خصوصاً کانولا که برای کشت پاییزه در شرایط ایران مناسب تشخیص داده شده، در زمره سیاستهای کلان بخش کشاورزی کشور قرار گرفته است. سطح زیر کشت ارقام مختلف کانولا در ایران حدود یک صد هزار هکتار با میانگین تولید ۱/۵ تن در هکتار است. دانه‌های روغنی خانواده براسیکا حاوی

حدود ۴۰ درصد روغن و ۲۶-۱۷ درصد پروتئین ( $N \times 6/25$ ) میباشند (۲۸). دانه‌های کلزا *Brassica napus* و سایر دانه‌های روغنی وابسته به خانواده *Crociferae* نظیر *B. joncea*، *B. compestris*، *B. nigra* و *B. carinata* غنی از پروتئین خوراکی می‌باشند [۱۷]. کنجاله کلزا/کانولا، محصول فرعی عملیات استخراج روغن، حاوی بیش از ۵۰ درصد پروتئین ( $N \times 6/25$ ) می‌باشد. کنجاله کانولا سرشار از پروتئین بوده که نتیجه تجمع پروتئین‌های ذخیره‌ای ناپین و کروسیفیرین و پروتئین ساختمانی اولئوزین در طی مراحل رشد دانه است [۲۸]. عواملی که استفاده از پروتئین کلزا/کانولا را در خوراک دام و مصارف انسانی توجیه پذیر می‌سازد عبارتند از: ۱- کنجاله کلزا/کانولا دارای ترکیب بسیار خوبی از اسیدهای آمینه ضروری بوده که با مقررات بهداشتی جهانی در خصوص نیاز انسان به اسیدهای آمینه مطابقت دارد [۱۷]، و دارای ارزش بیولوژیکی بالایی است. نسبت کارایی پروتئین کنجاله کلزا/کانولا ۲/۶۴ بوده که قابل مقایسه با مقدار ۲/۱۹ برای سویا می باشد [۶]. ۲- کنجاله کانولا دارای خصوصیات عملکردی قابل قبول برای مصرف در انواع فرمولاسیون مواد غذایی است [۱۳، ۳۱]. ۳- کیفیت پروتئین‌های کلزا/کانولا مشابه کازئین شیر و برتر از سایر منابع پروتئینی گیاهی نظیر سویا، نخود و گندم می باشد [۲۰]. ۴- ریسک شرایط آب و هوایی در کشت کانولا به حداقل کاهش می‌یابد، و لذا می‌توان آن را در زمستان که میزان خشکی باندازه تابستان نمی‌باشد، کشت نمود. استفاده از کلزا/کانولا به عنوان یکی از منابع پروتئینی غذایی شدیداً توسط حضور اجزاء نامطلوب نظیر گلوکوزینولات، فیتات‌ها و الیاف خام (پوسته) محدود می‌شود. در حضور آنزیم مایروزیناز [تیوگلوکوزید گلوکوزیداز] [۱۵]، گلوکوزینولات تجزیه و ترکیباتی نظیر تیوسیانات‌ها، ایزوتیوسیانات‌ها، نیتریل‌ها و

پروتئین تک یاخته‌ای بکار گرفته شد [۲۱]. در سال‌های بعد با تکمیل این سیستم، استخراج روغن از دانه‌های روغنی با تضمین بازیافت گلوکوزینولات و ترکیبات فنلی امکان پذیر شد [۲۱]. کاربرد تیمار متانول و یا متانول-آمونیاک موجب کاهش گلوکوزینولات کنجاله کاناوا گردید [۷]. استفاده از ترکیب آلکانول-آمونیاک-آب و هگزان به منظور تولید کنجاله‌ای با کیفیت بالا و همزمان استخراج روغن از کاناوا مورد بررسی قرار گرفت (۸). در ایران تا کنون مطالعاتی در مورد زمینه این تحقیق (پروتئین کاناوا) به مرحله اجرا در نیامده است. اهداف این تحقیق شامل تولید کنجاله‌های هگزانی و دوفازی از دانه کامل کاناوا *Brassica napus* (وارته‌های کوانتوم، پی.اف. ۷۰۴۵/۹۱ و هایولا ۴۰۱)، تعیین pH بهینه استخراج پروتئین و اسید فیتیک، تعیین pH ایزوالکتریک پروتئین تیمارهای مختلف و بررسی تأثیر روش استخراج دوفازی بر گلوکوزینولات محتوی، پروتئین و اسیدفیتیک کنجاله‌های روغن کشتی شده می‌باشد.

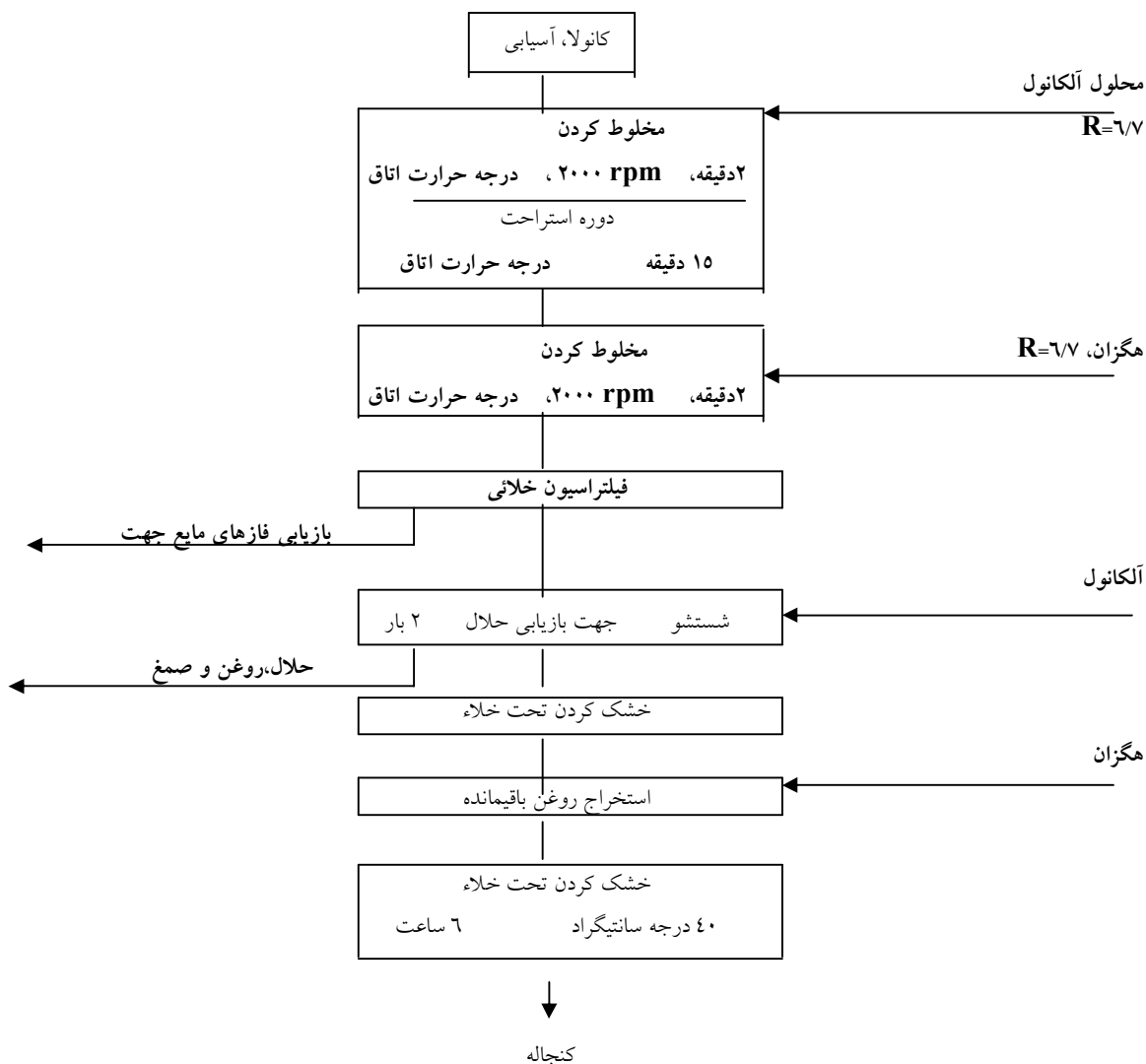
## ۲- مواد و روش‌ها

این تحقیق در دو محل به مرحله اجرا درآمد. تهیه ارقام، آماده سازی نمونه‌ها و تهیه کنجاله‌های هگزانی و دوفازی در آزمایشگاه صنایع غذایی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی گلستان (گرگان) و مراحل استخراج و تولید ایزوله پروتئینی و نیز تجزیه‌های شیمیایی در آزمایشگاه صنایع غذایی گروه مهندسی شیمی و شیمی کاربردی دانشگاه تورنتو، کانادا، به انجام رسید. وارته‌های کانولای مورد مطالعه (کوانتوم، پی.اف. ۷۰۴۵/۹۱ و هایولا ۴۰۱) هر سه از جنس *Brassica napus* و از ارقام کلزای دو صفر بودند که از شرکت سهامی توسعه کشت دانه‌های روغنی استان گلستان و از سطح مزارع تکثیری تهیه گردیدند. از دو روش برای تهیه کنجاله کاناوا استفاده شد. آماده‌سازی کنجاله هگزانی بوسیله آسیاب دانه کامل، عبور ماده آسیابی از غربال با مش ۶۰ و سپس استخراج روغن

اگزازولیدین تیون تولید می‌شود [۲۲،۳۰]. این ترکیبات عامل تأثیر نامطلوب روی رشد و تولید مثل طپور می‌باشند [۴،۱۲]. با غیرفعال نمودن مایروزیماز بوسیله حرارت می‌توان از تشکیل محصولات سمی جلوگیری نمود [۱۱]. چنین تیماری خصوصیات عملکردی پروتئین کلزا/کانولا را تحت تأثیر قرار داده و استفاده از آن را با محدودیت مواجه می‌سازد. نیتریل موجب آسیب کبد و کلیه‌ها می‌گردد. فیتات‌ها قابلیت دسترسی حیاتی به اکثر یون‌های فلزی چند ظرفیتی خصوصاً روی و آهن را کاهش داده و لذا در متابولیسم آنها خلل ایجاد می‌نمایند [۱۴]. این ترکیبات سمی و ضد تغذیه‌ای باید قبل از اینکه محصولات پروتئینی کاناوا به عنوان یک منبع پروتئینی در رژیم غذایی انسان وارد شود، به صورت کامل از آن جدا گردد، و یا به حداقل ممکن رسانده شوند.

فرآیندهایی شامل تکنیک‌های مختلف برای جداسازی پروتئین کاناوا بر اساس حل شدن پروتئین کنجاله بدون چربی و متعاقب آن بازیافت پروتئین توسط ترسیب ایزوالکتریک ارائه شده است [۷،۱۶،۲۴]. سلامت کنجاله و ایزوله‌های پروتئینی کاناوا برای مصارف انسانی با استفاده از حیوانات آزمایشگاهی مورد آزمون و ارزیابی قرار گرفته است [۲۰]. تولید ایزوله پروتئینی رسوبی معمولاً با تهیه مخلوطی از مواد خام در محلول آبی قلیایی شروع می‌شود. پس از جداسازی پسمان کنجاله، پروتئین محلول بوسیله ترسیب ایزوالکتریکی بازیابی می‌گردد [۱۱،۲۳،۲۶]. در سال‌های اخیر روش استخراج دو فازی جهت حذف ترکیبات نامطلوب کلزا/کانولا ارائه شده است. یک فاز شامل متانول-آمونیاک-آب یا متانول-آب و فاز دیگر هگزان [۸،۱۸،۱۹] می‌باشد. مروری بر روش‌های مختلف حذف گلوکوزینولات ارائه گردید [۱۵]. این روش‌ها به دلیل افت بالای مواد جامد، تضعیف خصوصیات عملکردی و یا هزینه‌های بالای تولید، در سطوح تجاری مورد استفاده قرار نگرفته‌اند. سیستم حلال شامل متانول و یا متانول حاوی آمونیاک برای شکستن دیواره سلولی

آن با هگزان در دستگاه سوکسله به مدت ۱۸ ساعت و نهایتاً خشک کردن در ۵۰-۴۰ درجه سانتیگراد و به مدت ۴-۶ ساعت. کنجاله دوفازی (متانول-آب و هگزان) با



شکل ۱- نمودار جریان سیستم استخراج دوفازی روغن کانولا (۱۹)

۹۰ گرم نمونه به نسبت ۱ به ۶/۷ با محلول متانول حاوی ۱۰ مرحله اول با ۷۵ میلی لیتر محلول متانول حاوی ۱۰ درصد آب و درصد آب، در مخلوط کن به مدت ۲ دقیقه و با حداکثر سرعت مرحله دوم با ۷۵ میلی لیتر متانول خالص. در هر دو مرحله (۲۰۰۰ دور در دقیقه) مخلوط شد. بعد از یک دوره استراحت ۱۵ شستشو دوره استراحت ۱۰ دقیقه ای اعمال گردید. کنجاله شسته دقیقه ای، هگزان با همان نسبت قبلی به مخلوط اضافه و با همان شده به مدت ۲۴ ساعت در شرایط تهویه مناسب خشک گردید. شرایط قبل نیز مخلوط گردید. محلول آبی حاصله تحت سپس استخراج روغن باقیمانده با دستگاه سوکسله و حلال هگزان فیلتراسیون خلأی با استفاده از کاغذ صافی واتمن نمره ۴۲ قرار به مدت ۱۲ ساعت و در نهایت خشک کردن نهایی در ۴۰-۵۰ داده شد. سپس شستشوی دو مرحله ای باقیمانده روی کاغذ صافی:

به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد و محلول رویی تحت فیلتراسیون خلالتی با کاغذ صافی واتمن نمره ۴۱ قرار گرفت. مرحله بعد شامل شستشوی رسوب به نسبت ۱ به ۱۰ با آب مقطر دارای همان pH ایزوالکتریک اعمال شده بود. محلول رویی و مایعات حاصل از شستشو با یکدیگر مخلوط گردید که برای تولید ایزوله پروتئینی محلول استفاده شد. راندمان پروتئین رسوبی بر حسب وزن رسوب بدست آمده و پروتئین محتوی آن محاسبه گردید.

### ۵- تجزیه های شیمیایی

تعیین رطوبت طبق روش A-154-44 [۲]. تعیین محتوای پروتئین ( $N \times 6.25$ ) طبق روش کلدال [۱] و با استفاده از هضم کننده بوشی ۴۲۵ و واحد تقطیر بوشی ۳۱۵. تعیین میزان گلوکوزینولات کل طبق روش وتر و یانگ [۳۰] و بر اساس جذب ویژه نور فرابنفش ترکیبات تیواوره و اگزازولیدین-۲-تیون. در این روش از روی دانسیته نوری تصحیح شده، میزان ایزوتیوسیانات کل بر حسب میلی گرم ۳-بوتیل ایزوتیوسیانات (۳-BITC) در گرم و میزان ترکیب اگزازولیدین-۲-تیون کل بر حسب میلی گرم ۵-وینیل اگزازولیدین-۲-تیون در گرم تعیین شد و مجموع آنها بصورت گلوکوزینولات کل گزارش گردید.

$$OD_{245COFF} = OD_{245} \times 0.5 \times (OD_{230} + OD_{255})$$

$$OD_{245COFF} \times (28/55) = \text{میلی گرم } 3\text{-بوتیل}$$

ایزوتیوسیانات در گرم نمونه

$$OD_{245COFF} \times (22/1) = \text{میلی گرم } 5\text{-وینیل اگزازولیدین-}$$

۲- تیون در گرم نمونه

تعیین اسید فیتیک محتوی بوسیله روش فبلز و همکاران [۱۰] و شامل هضم اولیه نمونه با محلول اسید کلریدریک-سولفات سدیم، هضم ثانویه محلول شفاف تهیه شده بوسیله محلول اسید کلریدریک-سولفات سدیم، محلول

درجه سانتی گراد و به مدت ۶-۴ ساعت. ۶۰۰ گرم نمونه از هر کدام از کنجاله های تولیدی تهیه شد.

### ۳- استخراج قلیایی

در هر اندازه گیری، دیسپرسیونی از ۱۰ گرم کنجاله مورد نظر در ۱۸۰ میلی لیتر آب مقطر در درجه حرارت اتاق تهیه و در یک pH از پیش تعیین شده (بین ۹/۵ تا ۱۲/۰ با گام ۰/۵ واحد) نگاه داشته شد. میزان pH بوسیله هیدروکسید سدیم ۵ درصد در حد pH مورد نظر تنظیم و ثابت نگاه داشته شد. مدت زمان نگاهداری در pH مورد نظر برای کنجاله های هگزانی و دوفازی به ترتیب ۳۰ و ۶۰ دقیقه بود. محلول آبی حاصله در ۵۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. محلول رویی تحت فیلتراسیون خلالتی با کاغذ صافی واتمن نمره ۴۱ قرار گرفت. بعد از سانتریفوژ و صاف کردن، پسمان کنجاله دو بار و هر بار با نسبت حلال به کنجاله (۶ به ۱) با آب مقطر دارای pH مرحله استخراج، شستشو داده شد. تمامی محلول های حاصل از شستشو با عصاره اصلی مخلوط گردید. پسمان کنجاله شسته شده در اون تحت خلاء، ۵۰ درجه سانتی گراد و به مدت ۴ ساعت خشک شد.

### ۴- ترسیب ایزوالکتریک

ترسیب پروتئین های محلول در مقادیر مختلف pH مورد آزمایش قرار گرفت. pH بهینه مرحله استخراج قلیایی در مورد تمامی کنجاله های مورد مطالعه، pH ۱۲/۰ بود. به ۳۰۰ میلی لیتر از محلول حاصل از مرحله استخراج قلیایی، اسید کلریدریک ۶ نرمال اضافه و pH تا حد از پیش تعیین شده، در دامنه ۷/۵-۳/۵ با گام ۰/۵ واحد، پایین آورده شد و به مدت ۱۵ دقیقه با افزودن اسید کلریدریک ۱ نرمال در این pH باقی ماند. سوسپانسیون حاصله در ۵۰۰۰ rpm و

جدول ۱- ترکیب شیمیایی کنجاله هگزانی و دوفازی کانولای ایران

نمونه	پروتئین (N × ۶/۲۵) (%)	۱VOT	۳-BITC (میلی گرم بر گرم) اسید فیتیک	اسید فیتیک (%)
کواتوم				
A	۴۲/۱	۰/۲۳	۰/۵۱	۲/۹۱
B	۴۷/۳	۰/۱۲	۰/۲۱	۳/۰۸
پی. اف				
A	۴۲/۸	۰/۱۰	۰/۲۲	۲/۸۴
B	۴۸/۱	۰/۰۹	۰/۱۳	۲/۹۸
هایولا				
A	۳۸/۹	۰/۴۵	۰/۸۴	۳/۰۲
B	۴۳/۷	۰/۱۹	۰/۴۲	۳/۱۶

A: استخراج تک فازی روغن توسط هگزان. B: استخراج دوفازی روغن توسط متانول-آب و هگزان.  
۱: ۵- وینیل اگرازولیدین-۲- تیون  
۲: ۳- بوتنیل ایزوتیوسیانات.

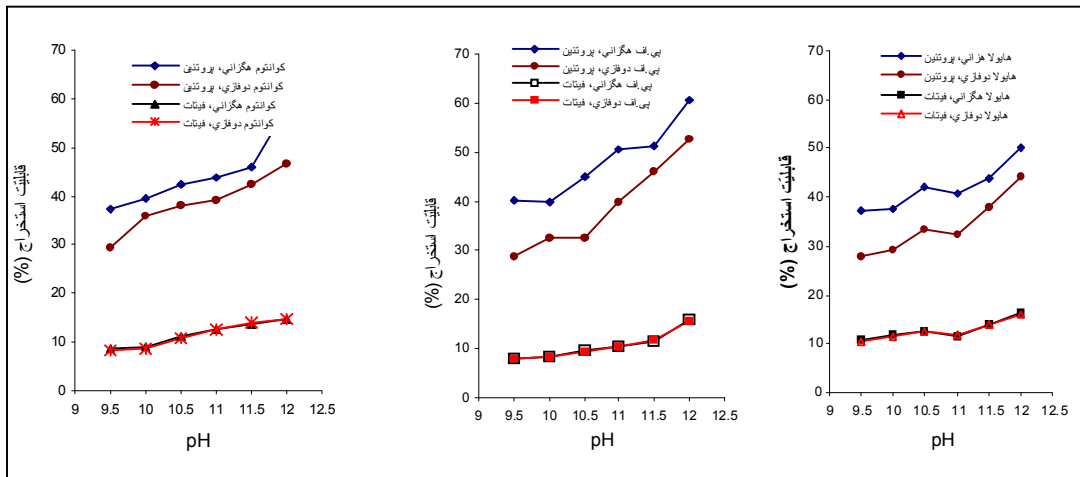
#### ۷- قابلیت استخراج پروتئین و اسید فیتیک

تأثیر pH مرحله استخراج قلیایی روی حلالیت پروتئین (N × ۶/۲۶) و اسید فیتیک کنجاله‌های هگزانی و دوفازی حاصل از واریته‌های کانولای ایران در شکل شماره ۲ نشان داده شده است. نتایج این تحقیق نشان داد که افزایش pH در طی مرحله استخراج موجب افزایش قابل توجه در میزان حلالیت پروتئین می‌گردد و تفاوت بسیار معنی دار ( $P > 0/01$ ) وجود دارد. pH بالاتر از ۱۱ موجب افزایش چشمگیر در میزان قابلیت استخراج پروتئین تمامی کنجاله‌های مورد آزمایش گردید.

۰/۰۲ مولار آهن (III) و محلول ۲۰ درصد اسید سولفوسالیسیلیک و نهایتاً تیتراسیون با محلول ۰/۰۱ مولار EDTA  
 $(B - V) / P \times 1/32 =$  اسید فیتیک (درصد)  
B: تیتراسیون شاهد.  
V: حجم محلول EDTA مصرفی (میلی لیتر).  
P: وزن نمونه (گرم).

#### ۶- نتایج و بحث

مقادیر برخی از ترکیبات شیمیایی کنجاله‌های هگزانی و دوفازی در جدول شماره ۱ آورده شده است. تأثیر هر یک از تیمارهای رقم و روش استخراج دوفازی بر میزان پروتئین کنجاله‌ها بسیار معنی دار ( $P > 0/01$ ) بود، چنانکه روش استخراج دوفازی منجر به افزایش حدود ۱۵ درصد در میزان پروتئین گردید. افزایش پروتئین در نتیجه حل شدن حدود ۲۵ درصد از مواد جامد محلول شامل کربوهیدرات‌ها، فسفولیپیدها و سایر ترکیبات غیرپروتئینی در فاز متانول می‌باشد [۸]. گلوکوزینولات محتوی کنجاله‌ها نیز تحت تأثیر رقم و روش استخراج قرار داشت و اختلاف معنی دار ( $P > 0/01$ ) مشاهده شد. گلوکوزینولات کنجاله دوفازی به دلیل کاربرد متانول حدود ۵۰ درصد کاهش نشان داد. هر چند که میزان گلوکوزینولات نمونه‌ها در حد پایین بود، ولی کاربرد متانول موجب گردید تا در برخی موارد به حد تشخیص روش وتر و یانگ (۱/۷ میکرومول در گرم کنجاله) برسد، که در این حالت نمونه فاقد گلوکوزینولات فرض می‌شود. نتایج به دست آمده، گزارشات دیوشدی و رویین [۸] را تصدیق می‌نماید. اسید فیتیک محتوی کنجاله‌ها تحت تأثیر رقم و روش استخراج نبود، و اختلاف معنی دار آماری ( $P > 0/05$ ) مشاهده نگردید.



شکل شماره ۲- اثر pH بر قابلیت استخراج پروتئین و اسید فیتیک کنجاله‌های هگزانی و دوفازی کانولا.

علاوه بر ماهیت پروتئین به نظر می‌رسد که اسید فیتیک محتوی دارای تأثیر قابل ملاحظه‌ای بر میزان حلالیت نیتروژن باشد. اسید فیتیک عمده ترین ترکیب حاوی فسفر در کنجاله کلزا/کانولا است. قابلیت استخراج اسید فیتیک کنجاله‌های مورد تحقیق در دامنه pH بین ۱۰ و ۱۲، حداکثر بین ۱۱/۹ درصد (پی.اف هگزانی) و ۱۶/۳ درصد (هایولا هگزانی) بود. اثر pH بر حلالیت اسید فیتیک معنی‌دار ( $P > 0/01$ ) بود. نتایج به دست آمده در این تحقیق (شکل شماره ۲) با مقادیر گزارش شده توسط تزنگ و همکاران [۲۷] و گیلبرگ و تورنل [۱۱] مطابقت دارد. حضور اسید فیتیک در عصاره‌های پروتئینی کلزا/ کانولا موجب تسهیل در ترسیب پروتئین، به دلیل تشکیل کمپلکس‌های غیر محلول فیتات-پروتئین می‌شود [۳]. در این مطالعه دستیابی به راندمانی متوسط در مورد استخراج پروتئین می‌تواند به حضور مقادیری هر چند کم از اسید فیتیک در عصاره ارتباط داشته باشد، زیرا در pH بالا، حلالیت اسید فیتیک بسیار کم گزارش شده است و حضور اسید فیتیک در عصاره پروتئینی شدیداً روی میزان بازیافت پروتئین، استفاده از دامنه pH برای ترسیب و ماده خشک محتوی رسوب تأثیر می‌گذارد [۱۱]. برهم کنش پروتئین و

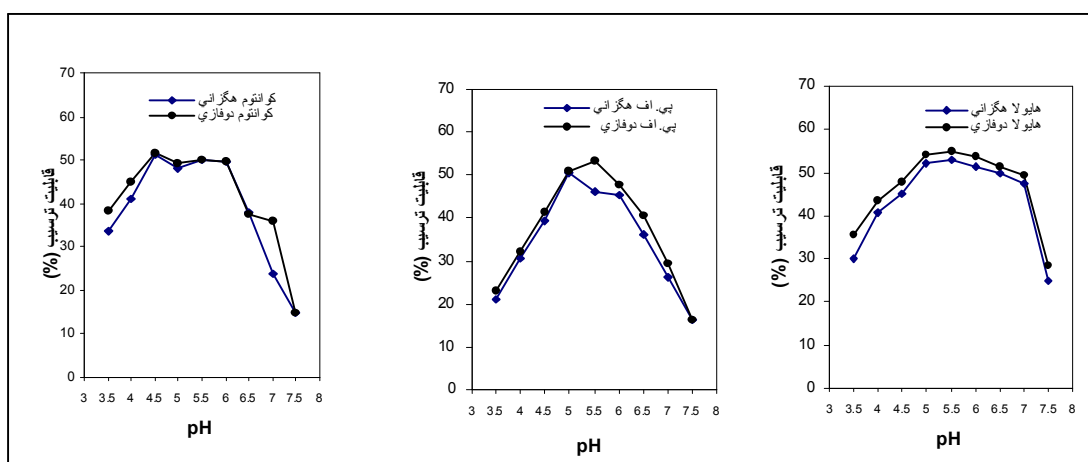
نتایج این تحقیق نشان داد که pH بهینه استخراج پروتئین در مورد کنجاله‌های هگزانی و دوفازی، pH ۱۲/۰ می‌باشد. تأثیر متقابل رقم × روش × pH بر استخراج پروتئین معنی‌دار ( $P > 0/05$ ) نبود. تأثیر رقم ( $P > 0/01$ ) و اثر متقابل رقم × روش ( $P > 0/05$ ) بر حلالیت پروتئین معنی‌دار نبود. اختلاف معنی‌دار ( $P > 0/05$ ) در حلالیت پروتئین تحت تأثیر اثر متقابل روش استخراج × pH وجود نداشت. روش استخراج تأثیر معنی‌دار ( $P > 0/01$ ) روی حلالیت پروتئین داشت. میزان استخراج پروتئین از کنجاله‌های هگزانی در pH ۹/۵ تا ۱۲/۰ بین ۲۷/۳ و ۶۰/۷ درصد بود. اگر چه اکثر مطالعات دیگر دلالت بر قابلیت استخراج پروتئین بیشتر از ۸۵ درصد دارد، نتایج ما مقادیر کمتری از حلالیت پروتئین را نشان داد. بیشترین راندمان استخراج پروتئین در این تحقیق ۶۰/۷ درصد و مربوط به کنجاله هگزانی واریته پی.اف بود. میزان استخراج پروتئین کنجاله‌های هگزانی بین ۵۰/۳ درصد (هایولا) و ۶۰/۷ درصد (پی.اف) قرار داشت و کاهش معادل ۲۰/۱، ۱۳/۲ و ۱۲/۳ درصد در میزان استخراج پروتئین کنجاله‌های دوفازی تهیه شده به ترتیب از سه رقم کوانتوم، پی.اف و هایولا مشاهده شد.

باقیمانده‌های اسید آمینه حاوی بار مثبت در pH بالاتر از ۱۰ می‌باشند. تفاوت در میزان حلالیت پروتئین و اسید فیتیک کنجاله‌های کلزا/ کانولا در مقادیر مختلف pH، اساس جداسازی و بازیافت اسید فیتیک است [۱۱]. کمینه میزان استخراج اسید فیتیک از کنجاله‌های هگزانی و دوفازی تهیه شده از ارقام مورد مطالعه در pH ۹/۵ و بیشینه آن در pH ۱۲/۰ تعیین گردید.

### ۸- قابلیت ترسیب پروتئین

تأثیر pH روی ترسیب پروتئین‌های استخراج شده از کنجاله‌های هگزانی و دوفازی جهت تعیین شرایط بهینه بازیابی پروتئین محلول در محلول آبی هیدروکسید سدیم، بر اساس وزن خشک و پروتئین محتوی رسوب بدست آمده، مورد آزمایش قرار گرفت (شکل شماره ۳).

اسید فیتیک در نتیجه جاذبه ناشی از بار الکتریکی است. در مقادیر pH پایین‌تر از pH ایزوالکتریک، پروتئین‌های دارای بار مثبت با اسید فیتیک همیشه دارای بار منفی تشکیل کمپلکس می‌دهند. اعتقاد بر این است که یون‌های اضافی کلسیم از طریق رقابت با گروه‌های کاتیونی پروتئین‌ها برای اسید فیتیک، باعث شکستن و تجزیه کمپلکس می‌گردد [۵]. در pH بالاتر از pH ایزوالکتریک، اسید فیتیک از طریق یون‌های فلزی چند ظرفیتی با پروتئین واکنش کرده و یک کمپلکس سه گانه محلول اسید فیتیک-کاتیون-پروتئین را تشکیل می‌دهد. در pH بالا (۱۰/۰-۱۲/۰) برهم کنش بین پروتئین و اسید فیتیک کاهش می‌یابد. افزایش pH با افزایش حلالیت پروتئین همراه خواهد بود، و بنابراین قابلیت استخراج اسید فیتیک نیز افزایش می‌یابد. پروتئین‌های کلزا/ کانولا تقریباً حاوی مقادیر یکسانی از اسیدهای آمینه آرژینین و لیزین، تنها



شکل ۳- اثر pH روی قابلیت ترسیب پروتئین محلول عصاره تهیه شده در pH ۱۲/۰، حاصل از تیمارهای آزمایش.

pH ۳/۵، یعنی جایی که حدود ۵۰ درصد از نیتروژن محلول رسوب می‌کند، است [۹،۲۷]. همانطور که در شکل شماره ۳ نشان داده شده است، pH ۳/۵ به دلیل راندمان پایین بازیافت، نمی‌تواند pH بهینه ترسیب

نتایج این تحقیق نشان داد که pH در طی مراحل استخراج و نیز ترسیب تأثیر بسیار معنی‌دار ( $P > 0.01$ ) روی راندمان بازیابی پروتئین داشت. تحقیقات گذشته نشان داده بود که حداکثر قابلیت ترسیب پروتئین کانولا نزدیک به



عمدتاً حاوی پوسته و در مورد واریته‌های کوانتوم، پی.اف و هایولا بترتیب حاوی ۳۹/۱، ۳۵/۳ و ۴۳/۶ درصد از پروتئین کل کنجاله آزمایشی بودند. اکثر اسید فیتیک (۸۸/۱-۸۵/۳) درصد در پسمان کنجاله ظاهر گردید. پروتئین رسوبی حاوی حدود ۸ درصد اسید فیتیک بود که علت آن می‌تواند پایین بودن میزان ماده جامد و از طرف دیگر وجود مقادیر بالایی از ترکیبات محلول غیر پروتئینی (۲۵ درصد) باشد.

خصوصیات شیمیایی و راندمان تولید محصولات پروتئینی حاصل از کنجاله‌های دوفازی کانولای ایران تحت تأثیر استخراج قلیایی (بوسیله هیدروکسید سدیم ۵ درصد و در pH ۱۲/۰) در جدول شماره ۳ آورده شده است. pH بهینه ترسیب ایزوالکتریکی پروتئین کنجاله‌های دوفازی ارقام کوانتوم، پی.اف و هایولا به ترتیب عبارت است از ۴/۵، ۵/۵ و ۵/۵. راندمان تولید پروتئین رسوبی حدود ۱۰/۵-۷/۵ درصد از مواد جامد کل کنجاله، معادل حدود ۱۷ درصد از نیتروژن کل، است. پروتئین رسوبی حاصله فاقد گلوکوزینولات و حاوی مقادیر پایین اسید فیتیک بود. قابلیت استخراج پروتئین کنجاله‌های دوفازی به مراتب پایین‌تر از مقادیر مشابه در کنجاله‌های هگزانی بود (معنی دار در سطح ۱ درصد). می‌توان این نتیجه را با دنا توره و یا آب زدایی شدن پروتئین‌ها در طی مراحل آماده سازی مرتبط دانست. میزان پروتئین پسمان کنجاله دوفازی حدود ۳۶ درصد بود که بیانگر پتانسیل آن برای استفاده در خوراک دام می‌باشد. بیشترین راندمان تولید پروتئین رسوبی (۱۵/۴ درصد) مربوط به کنجاله هگزانی واریته پی.اف بود. تفاوت در حلالیت بخش پروتئینی، ناشی از اختلاف در جزئیات ترکیب شیمیایی آنها و نهایتاً واریته و شرایط محیطی رشد می‌باشد.

پروتئین از کنجاله‌های هگزانی و دوفازی ارقام کانولای ایران باشد. بر اساس نتایج به دست آمده pH بهینه ترسیب در دامنه pH ۴/۵-۵/۵ قرار دارد و در این محدوده اختلاف معنی دار بین تیمارها ( $P > 0/05$ ) وجود ندارد. نتایج این تحقیق نشان داد که در pH کمتر از ۴/۰ فقط بخش کوچکی از پروتئین‌های محلول رسوب می‌کنند و با افزایش pH تا ۵/۵ میزان بازیافت پروتئین شدیداً افزایش می‌یابد. از pH ۶/۰ به بالا بازیافت پروتئین شروع به کاهش نموده و بنابراین می‌توان نقاط ایزوالکتریکی مختلفی را تعریف کرد. بیشینه راندمان ترسیب برای تمامی کنجاله‌های مورد آزمایش، در pH بین ۴/۵ تا ۵/۵ مشاهده شد که بیش از ۵۰-۵۵ درصد از پروتئین استخراج شده، در رسوب بازیافت گردید. با توجه به شکل شماره ۲، حداکثر قابلیت ترسیب دارای دامنه تقریباً وسیعی است. در بالاتر از این محدوده، بازیافت پروتئین کاهش می‌یابد. در برخی موارد خصوصاً کنجاله هگزانی، نتایج حاصله با آنچه که توسط تزنگ و همکاران [۲۷] مبنی بر دستیابی به ۵۰/۱ درصد بازیابی پروتئین محلول کنجاله‌های هگزانی کانولا در pH ۳/۵، مشابهت داشت.

تأثیر استخراج قلیایی (بوسیله هیدروکسید سدیم ۵ درصد و در pH ۱۲/۰) و ترسیب ایزوالکتریکی روی کنجاله‌های هگزانی کانولای ایرانی در جدول شماره ۲ آورده شده است. حدود ۶۵-۷۰ درصد از پروتئین موجود در کنجاله آزمایشی (جدول شماره ۲) به صورت دو محصول قابل استفاده شامل پسمان کنجاله و ایزوله پروتئینی رسوبی، بازیابی شد. میزان گلوکوزینولات در محصول پروتئین رسوبی پایین‌تر از حد تشخیص بود. در بین کنجاله‌های هگزانی، بیشینه راندمان بازیافت پروتئین رسوبی مربوط به رقم پی.اف بود که معادل ۳۰/۷ درصد از پروتئین کل موجود در کنجاله آزمایشی مربوطه است. پسمان کنجاله‌ها

جدول شماره ۲- تأثیر ترسیب ایزوالکتریکی بر کنجاله‌های هگزانی کانولا استخراج شده با ۰.۵% NaOH و در pH ۱۲/۰

نمونه	پروتئین (درصد)	گلوکوزینولات (میکرومول در گرم)	اسید فیتیک (درصد)	راندمان (درصد از کنجاله آزمایشی)			
				مواد جامد	پروتئین	گلوکوزینولات	اسید فیتیک
<b>کواتوم</b>							
کنجاله آزمایشی	۴۲/۱ ± ۱/۱۰	۶۳	۲/۹۱ ± ۰/۰۸	۱۰۰/۰	۱۰۰/۰	۱۰۰/۰	۱۰۰/۰
پسمان کنجاله	۳۳/۱ ± ۱/۶۶	> ۱/۷	۴/۹۸ ± ۰/۱۷	۴۹/۸ ± ۱/۳۵	۳۹/۱ ± ۲/۴۸	۰	۸۵/۳ ± ۲/۳۱
پروتئین رسوبی	۸۴/۰ ± ۱/۱۵	> ۱/۷	۱/۷۱ ± ۰/۱۷	۱۴/۸ ± ۰/۹۶	۲۹/۵ ± ۱/۰۶	۰	۸/۷ ± ۰/۲۱
<b>پی‌اف</b>							
کنجاله آزمایشی	۴۲/۸ ± ۰/۷۰	۲/۷	۲/۸۴ ± ۰/۱۵	۱۰۰/۰	۱۰۰/۰	۱۰۰/۰	۱۰۰/۰
پسمان کنجاله	۳۳/۴ ± ۱/۶۵	> ۱/۷	۵/۵۴ ± ۰/۲۵	۴۵/۲ ± ۱/۴۹	۳۵/۳ ± ۳/۲۴	۰	۸۸/۱ ± ۲/۴۳
پروتئین رسوبی	۸۵/۳ ± ۱/۶۹	> ۱/۷	۰/۹۰ ± ۰/۱۹	۱۵/۴ ± ۱/۱۵	۳۰/۷ ± ۲/۵۵	۰	۴/۹ ± ۱/۸۳
<b>هایولا</b>							
کنجاله آزمایشی	۳۸/۹ ± ۰/۵۰	۱۱/۰	۳/۰۲ ± ۰/۱۴	۱۰۰/۰	۱۰۰/۰	۱۰۰/۰	۱۰۰/۰
پسمان کنجاله	۳۳/۳ ± ۰/۷۲	> ۱/۷	۴/۸۴ ± ۰/۱۸	۵۲/۲ ± ۲/۸۲	۴۴/۶ ± ۱/۰۰	۰	۸۳/۷ ± ۱/۵۱
پروتئین رسوبی	۸۳/۶ ± ۱/۹۱	> ۱/۷	۱/۸۴ ± ۰/۱۱	۱۲/۳ ± ۱/۲۲	۲۶/۴ ± ۱/۷۶	۰	۷/۵ ± ۱/۳۰

نتایج عبارت است از: میانگین ۳ تکرار ± SD.

جدول شماره ۳- تأثیر ترسیب ایزوالکتریکی روی کنجاله‌های دو فازی کانولا استخراج شده با ۰.۵% NaOH و در pH ۱۲/۰

نمونه	پروتئین (درصد)	گلوکوزینولات (میلی‌گرم در گرم)	اسید فیتیک (درصد)	راندمان (درصد از کنجاله آزمایشی)			
				مواد جامد	پروتئین	گلوکوزینولات	اسید فیتیک
<b>کواتوم</b>							
کنجاله آزمایشی	۴۷/۳ ± ۰/۶۰	۰/۲۹ ۰/۰۵	۳/۰۹ ± ۰/۰۴	۱۰۰/۰	۱۰۰/۰	۱۰۰/۰	۱۰۰/۰
پسمان کنجاله	۳۳/۱ ± ۱/۶۶	> ۱/۷	۴/۶۶ ± ۰/۱۷	۵۹/۲ ± ۱/۴	۴۵/۳ ± ۲/۰	۰	۸۹/۳ ± ۴/۸
پروتئین رسوبی	۸۳/۷ ± ۱/۸۵	> ۱/۷	۱/۱۴ ± ۰/۱۱	۱۰/۵ ± ۰/۴	۱۸/۶ ± ۱/۱	۰	۳/۹ ± ۰/۴
<b>پی‌اف</b>							
کنجاله آزمایشی	۴۸/۱ ± ۰/۷۰	۰/۲۲ ۰/۰۵	۲/۹۴ ± ۰/۱۱	۱۰۰/۰	۱۰۰/۰	۱۰۰/۰	۱۰۰/۰
پسمان کنجاله	۳۵/۶ ± ۰/۹	> ۱/۷	۴/۶۷ ± ۰/۲۷	۵۷/۲ ± ۲/۸	۴۲/۴ ± ۱/۷	۰	۹۰/۷ ± ۴/۶
پروتئین رسوبی	۸۴/۸ ± ۱/۶۱	> ۱/۷	۰/۴۵ ± ۰/۱۰	۹/۴ ± ۰/۴	۱۶/۶ ± ۰/۹	۰	۱/۴ ± ۰/۲۶
<b>هایولا</b>							
کنجاله آزمایشی	۴۳/۷ ± ۰/۵۰	۰/۶۱ ۰/۰۹	۳/۰۴ ± ۰/۰۳	۱۰۰/۰	۱۰۰/۰	۱۰۰/۰	۱۰۰/۰
پسمان کنجاله	۳۷/۱ ± ۰/۴	> ۱/۷	۴/۶۳ ± ۰/۰۸	۶۲/۶ ± ۱/۲	۵۳/۱ ± ۱/۱	۰	۹۵/۴ ± ۱/۵
پروتئین رسوبی	۸۵/۷ ± ۱/۸	> ۱/۷	۱/۴۷ ± ۰/۱۵	۷/۵ ± ۰/۲	۱۴/۷ ± ۰/۴	۰	۳/۶ ± ۰/۴

نتایج عبارت است از: میانگین ۳ تکرار ± SD.

- [7] Diosady, L. L., Y- M. Tzeng, and L. J. Rubin. 1984. Preparation of rapeseed protein concentrates and isolates using Ultrafiltration. *J. Food Sci.* 49, 768-770.
- [8] Diosady, L. L., M. Naczka, and L. J. Rubin. 1985. The effect of ammonia concentration on the properties of Canola meals produced by ammonia-methanol/ hexane extraction system. *Food Chem.* 18, 121- 130.
- [9] Diosady, L. L., L. J. Rubin and B. K. Chen. 1990. In W. E. L. Spiess, and H. Schubert, *Engineering and Applied Science*, London.
- [10] Febles, C. I., A. Arias, C. Hardisson, A. Rodriguez, and A. Sierra. 2001. Phytic acid level in infant flours. *Food Chem.* 74, 437- 441.
- [11] Gillberg, L., and B. Törnell. 1976. Preparation of Rapeseed Protein Isolates. *J. Food Sci.* 41, 1063.
- [12] Hill, R. 1979. A review of the “ Toxic” effects of rapeseed meals whit observation on meal from improved varieties. *Brit. Vet. J.* 135, 3.
- [13] Igor, S. O., L. L. Diosady., and L. J. Rubin. 1993. Catalytic deamidation of canola proteins. *Act. Aliment.* 22, 325-336.
- [14] Jones, J. D. 1979. Rapeseed protein concentrate: Preparayion and Evaluation. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 56 . 716-720.
- [15] Maheshwari, P. N., D. W. Stanley., and J. I. Gray. 1981. Detoxification of Rapeseed Products. *J. Food Prot.* 44,459.

## سپاسگزاری

مراحل بسیاری از این تحقیق، در آزمایشگاه صنایع غذایی گروه مهندسی شیمی و شیمی کاربردی دانشگاه تورنتو، کانادا، به انجام رسید. بدینوسیله از پروفیسور دیوشدی (Levente. L. Diosady) بخاطر مشاوره‌های علمی و حمایت‌های عملی و مالی از این تحقیق تقدیر و تشکر می‌گردد.

## ۸-منابع

- [1] AACC. 1976. *Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists*. American Association of Cereal Chemists, Inc., st. paul, MN .
- [2] AOAC. 1984. *Official Methods of Analysis*, 14 ed; Association of Official Analytical Chemists : Washington, DC.
- [3] Blaicher, F. M., F. Elstner., W. Stein, and K. D. Mukherjee. 1983. Rapeseed protein isolates: Effect of processing on yield and composition of proteins. *J. Agric. Food Chem.* 31, 358- 362.
- [4] Butler, W. J., A. W. Pearson, and G. R. Fenwick. 1982. Problems which limit the use of rapeseed meals as a protein source in poultry diet. *J. Sci. Food Agric.* 33, 866.
- [5] Cheryan, M. 1980. Phytic acid interactions in food systems. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 13, 297.
- [6] Delisle, J., J. Amiot, G. Goulet, C. Simard, G. J. Brisson, and J. D. Jones. 1984. Nutritive value of protein fractions extracted from soybean, rapeseed, and wheat flours in the rat. *Qual. Plant. Plant Foods Hum. Nutr.* 34, 243- 251.

- [25] Tzeng, Y- M .1987. Process development for the production of high quality rapeseed (Canola) protein isolates using membrane technology. Ph.D. thesis, Dept. of Chemical Engineering and Applied Chemistry, Univ. of Toronto, Toronto, Ontario.
- [26] Tzeng, Y- M., L. L. Diosady., and L. J. Rubin. 1988. Preparation of rapeseed protein isolates using Ultrafiltration, Precipitation, and Diafiltration. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 21, 419.
- [27] Tzeng, Y- M .L. L. Diosady., and L. J. Rubin. 1990. Production of canola protein materials by alkaline extraction, precipitation, and membrane processing. *J. Food Sci.* 55, 147- 1156.
- [28] Uppström, B. 1995. Seed Chemistry. In D. Kimber, and D. I. McGregor, *Brassica* oilseeds: Production and Utilization (ed) (217- 239). CAB International. UK.
- [29] USDA. 2004. Official Statistics. Foreign Agricultural Service: Cotton, Oilseeds, Tobacco, and Seeds Division.
- [30] Wetter, L. R., and C. G. Youngs. 1976. A thiourea- UV assay for total glucosinolates in rapeseed meals. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 53, 62.
- [31] Xu, L., and L. L. Diosady. 1994. The Production of Chinese Rapeseed Protein Isolates by Membrane Processing. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71, 935- 939.
- [32] Zhou, B., Z. Q. He .H. M. Yu., and K. D. Mukherjee. 1990. Proteins from Double- Zero Rapeseed. *J. Agric. Food Chem.* 38, 690- 694 .
- [16] Maubois, J- L., J. Gulioli., and M- C. Chopin. 1976. Ultrafiltration process for obtaining protein isolates of vegetable origin. U. S. Patent No. 3, 993, 636.
- [17] Ohlson, R., and K. Anjou. 1979. Rapeseed protein products. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 56.431 .
- [18] Rubin, L. J., L. L. Diosady., and C. R. Phillips. 1984. Solvent extraction of oil bearing seeds. US Patent. No. 4, 460, 504.
- [19] Rubin .L. J., L. L. Diosady., M. Naczka., and M. Halfani. 1986. The Alkanol- Ammonia- Water/ Hexane Treatment of Canola. *J. Inst. Can. Sci. Technol.* 19, 57- 61.
- [20] Sarvar, G. R., R. Blair., M. Friedman., M. R. Gumbmann., L. R. Hackler., P. L. Pellet., and T. K. Smith. 1984. Inter- and intra- laboratory variability in rat growth assays for estimating protein quality of foods. *Association of Official Analytical Chemists.* 67, 976.
- [21] Schlingmann, M., and L. Vertesy. 1978. Reducing the lipid and nucleic acids content in microbial cell masses. *Fed. Rrp. Of Germany patent No.* 26, 33, 666.
- [22] Schlingmann, M., and G. W. Lipinski. 1982. Process for Improving the Properties of Meals and Flours of Oily Seeds. *Canadian Patent No.* 1, 120, 779.
- [23] Slinger, S. J. 1977. Improving the nutritional properties of rapeseed. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 44, 551 .
- [24] Thompson, L. U., P. A. Poon., and C. Procope. 1976. Isolation of rapeseed proteins using sodium hexametaphosphate. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 9, 15.

## Process Development for the Production of Precipitated Protein Isolate from Canola Meals

A. Ghodsvali<sup>1\*</sup>, M. Vosoughi<sup>2</sup>, M. H. Haddad Khodaparast<sup>3</sup>, F. Shahidi<sup>4</sup>

1. Department of Agricultural Engineering, Golestan Agricultural and Natural Resources Research Center, Gorgan, Iran.
2. Department of Chemical Engineering, Sharif University, Tehran, Iran.
3. Department of Food Science and Technology, Ferdosi University, Mashad, Iran
4. Department of Food Science and Technology, Ferdosi University, Mashad, Iran

In the present study the effect of variety and oil extraction method on the chemical composition (protein, glucosinolate and phytic acid) of hexane-extracted and two-phase solvent (methanol-water/hexane) meals from double-zero canola varieties (*Brassica napus*, cv. Quantum, PF 7045.91 and Hyola 401) were investigated. The suitable conditions for the extraction of proteins and phytic acid as well as protein precipitability of meals were determined. Two methods were applied to prepare of meals: Oil extraction with hexane or with methanol- water/hexane. The effect of oil extraction method on protein, glucosinolate and phytic acid content of meals was investigated. Alkaline extraction at pH between 9.5 and 12.0 and isoelectric precipitation at pH between 3.5 and 7.5, both of them in increments of 0.5 were examined. Variety and oil extraction method had reasonable significant effect ( $P < 0.01$ ) on protein and glucosinolate content. The Two-phase method brought about an increase in the protein content (15%) and decrease in the glucosinolate (50%). Although, it had no significant effect ( $P < 0.05$ ) on the phytic acid content. The optimum pH for protein extraction of all meals tested was 12.0. Oil extraction method had significant effect ( $P < 0.01$ ) on nitrogen solubility. The maximum yield of protein extraction was 60.7% (PF, Hexane-extracted meal). The phytic acid extractability at pH 12.0 was observed between 11.5 (PF, Single phase) and 16.2 (Hyola, Single and Two-phase). The effect of pH on protein precipitation was very significant ( $P < 0.01$ ). The maximum yield of protein precipitation was observed at pH-values between 4.5 and 5.5. Almost 60% of the proteins were recovered in two usable products: precipitated protein isolate and the meal residue with about 35% protein, suitable for animal feed. The glucosinolate content of precipitated protein isolates was below the detection limit ( $< 0.2$  mg/g). precipitated protein isolates had about 85% protein, and there was not significant differences ( $P < 0.01$ ) among them, although significant differences ( $P < 0.01$ ) was observed among their phytic acid content.

**Keywords:** Rapeseed/Canola, Two-phase solvent extraction, Alkaline extraction, Isoelectric precipitation, Precipitated protein isolate, Phytic acid, Glucosinolate.

\* Corresponding author e-mail address: [qodsevali@yahoo.com](mailto:qodsevali@yahoo.com)