مقاله علمی پژوهشی/ نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۳۲ شماره ۴/ سال ۱۴۰۱/ صفحات ۷۵ تا ۸۵
DOI: 10.22034/FR.2022.49947.1820

بررسی ویژگی های عملکردی پپتیدهای حاصل از هیدرولیز پروتئین آرد گندم سالم توسط پروتئاز موجود در گندم سن زده

مهسا یاری[۱]، محمدیار حسینی[۲*] و مهدی کدیور[۳]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۵/٤

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان
[۲] استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام
[۳] استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان
[*]مسئول مکاتبه:Email: m.hosseini@ilam.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: در این پژوهش، به بررسی تاثیر پروتئاز استخراجی از گندم سن زده (سرین پروتئاز) بر هیدرولیز آرد گندم سالم و تولید پپتید های آزاد حاصل از هیدرولیز پرداخته شده است. **هدف**: هدف از این مطالعه تولید پپتید های کوتاه زنجیر با خواص عملکردی و درمانی مفید مانند آنتی اکسیدانی توسط پروتئاز گندم سن زده می باشد. **روش کار**: آزمون های مورد بررسی در این پژوهش، آزمون تعیین فعالیت آنزیمی، آزمون درجه هیدرولیز به روش شناساگر اورتوفتالدهید، خواص عملکردی مانند حلالیت، آنتی اکسیدانی و امولسیون کنندگی، ظرفیت نگهداری حلال (SRC) و در ادامه عکسبرداری با میکروسکوپ الکترونی (SEM) بودند. آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SPSS در سطح اطمینان ۹۵ درصد انجام گرفت. **نتایج**: در این مطالعه مشاهده شد که فعالیت آنزیمی آرد گندم سن زده در مقایسه با آرد گندم سالم دارای تفاوت معناداری در سطح اطمینان ۹۵ درصد بود. درجه هیدرولیز آرد گندم تیمار شده با عصاره آنزیمی آرد سن زده در مقایسه با نمونه شاهد (آرد گندم سالم) افزایش پیدا کرد. در رابطه با طول پپتید نیز مشاهده شد که طول پپتید های ایجاد شده در آرد گندم سالم تیمار شده با عصاره آنزیمی سن زده بسیار کوتاه تر از طول پپتید های نمونه شاهد (آرد سالم) بود. با افزایش درجه هیدرولیز، خواص عملکردی مانند خاصیت آنتی اکسیدانی و حلالیت افزایش پیدا کرد اما ظرفیت امولسیون کنندگی روند نزولی داشت. نتایج حاصل از ظرفیت نگهداری حلال (SRC) نشان داد که با افزایش هیدرولیز، SRCدر حلال اسید لاکتیک کاهش پیدا کرد و در حلال آب بی تاثیر بود. در عکسبرداری با میکروسکوپ الکترونی (SEM) نیز مشاهده گردید که در گندم سن زده نسبت به گندم سالم ساختار پروتئینی تخریب گردیده و گویچه های پروتئینی تا حدودی از بین رفته اند. **نتیجه گیری کلی**: استفاده از پروتئاز عصاره آنزیمی سن زده در تولید پپتید های آزاد به خوبی عمل نموده است بنابراین یک روش مقرون به صرفه برای تولید پپتید های آزاد با خواص عملکردی خوب میباشد.

واژگان کلیدی: سرین پروتئاز، آبکافت، پپتید زیست فعال، خاصیت عملکردی، ظرفیت نگهداری حلال

مقدمه

سن آفت مهم غلات به ویژه گندم و جو در ایران است و سالانه خسارات اقتصادی قابل توجهی به مزارع غلات وارد می‌کند. در ایران از مرزهای غربی تا شرقی به جز کویر های مرکزی زیر پوشش این حشره قرار دارد. آفات از مهمترین عواملی هستند که منجر به کاهش عملکرد و کیفیت نانوایی گندم می‌شوند. بطوری که بشر سالانه میلیاردها ریال خسارت آفات بخصوص حشرات را تحمل می‌کند و سالانه حدود ۱۳۰ میلیون تن غلات که غذای حدود یک میلیارد نفر در سال تامین می‌کند که در اثر آفات و عوامل بیماری زا از بین می‌روند (نجفی میرک توحید، ۱۳۹۲). پروتئازها آنزیم هایی هستند که تجزیه پروتئین‌ها و شکستن پیوندهای پپتیدی و تولید انواع پپتید ها را کاتالیز می‌کنند. برخی ازآنها بر روی انتخاب محل هدف بسیار اختصاصی عمل می‌کنند، در حالی که بسیاری از آنها به طور غیر اختصاصی هستند (سالاس ۲۰۱۸). پروتئین ها به سه روش ۱- هیدرولیز توسط آنزیم گوارشی ۲- هیدرولیز توسط میکرواورگانیسم های پروتئولیتیک ۳- هیدرولیز از طریق تاثیر آنزیمهای پروتئولیتیک گیاهان شکسته می‌شوند. پپتید های فعال به عنوان اجزای پروتئینی خاصی تعریف شده اند که تاثیر مثبتی بر عملکرد یا شرایط بدن دارند و در نهایت ممکن است بر سلامت تاثیر بگذارند (کورهونن و فیلانتو ۲۰۰۶). آلوکو و همکاران (۲۰۰۳) تاثیر هیدرولیز آنزیمی را بر روی دانه کینوا مورد بررسی قرار دادند که نتایج نشان داد که از هیدرولیز پروتئین کینوا برای افزایش حلالیت آن و همچنین غنی سازی نوشیدنی های غذایی به منظور افزایش کیفیت آنها میتوان استفاده شود (آلوکو و همکاران ۲۰۰۳). کیومرثی و همکاران (۱۳۹۵) در پژوهش خود به بررسی خواص کیفی، عملکردی و زیست فعالی در گندم سن زده پرداختند. با افزایش درصد سن زدگی درجه هیدرولیز در نمونه افزایش پیدا می کند که به دنبال آن تغییراتی در روند خواص عملکردی مانند حلالیت و امولسیون کنندگی مشاهده شد که با افزایش درصد سن زدگی حلالیت نمونه افزایش پیدا کرد و خاصیت امولسیون کنندگی در گندم با سن زدگی ۲۵ درصد بالاترین مقدار بود اما با افزایش درصد سن زدگی و درجه هیدرولیز این ویژگی روند نزولی داشت. آنزیم تزریق شده از این آفت در دانه، یک پروتئاز قلیایی محلول در آب با فعالیت بهینه در۹= pH و دمای ٤٠- و ۳۵ درجه سانتی گراد است. این آنزیم از دسته سرین پروتئاز ها است و در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه پایدار است(کیومرثی و همکاران ۲۰۱۷). در سال ۲۰۱٤ الکساندرا تورابیکا و همکارانش در مورد اثرات آلودگی آفات گندم بر ترکیب پروتئین گلوتن گندم و تاثیر آن بر کیفیت آرد را مورد بررسی قرار دادند که نتایج بدست آمده نشان دهنده ی تغییرات در ترکیب پروتئین گندم مربوط به زیر واحد های گلیادین با وزن مولکولی کمتر از ۷۵ کیلو دالتون بود (تورابیکا و همکاران، ۲۰۱٤) استفاده از گندم سن زده برای بهبود خواص عملکردی سایر دانه های غلات یک امکان بالقوه بوده که در این مطالعه بدان پرداخته شد. نتایج نشان می دهند گندم سن زده میتواند بر ارزش تغذیه ایی و عملکردی سایر غلات بیفزاید.

مواد و روش‌ها

روش استخراج نسبی آنزیم از آرد گندم سن زده

ابتدا گندم های سن زده را از نوع سالم جدا کرده و توسط آسیاب آزمایشگاهی چکشی آسیاب شد و آرد تولیدی با درجه استحصال ۹۸ درصد تولید گردید. سپس ٤ گرم آرد را با ۲۰ سی سی بافر استات ۰/۲ مولار با pH =۳/۸ به خوبی مخلوط کرده و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام یخ انکوبه شد. در ادامه سوسپانسیون را با دور ۱۲۰۰۰g و دمای ۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سوپرناتانت را جمع آوری کرده و توسط میکروفیلتر با قطر ۰/٤۵ میکرون فیلتر

کرده و جهت نگهداری در فریزر ۱۸_ نگهداری گردید (وانگ گرنت ۱۹٦۹).

تعیین فعالیت آنزیمی از عصاره آنزیمی

طبق روش اینگلند و همکاران ۱۹٦۸ با کمی تغییرات انجام گرفت. ابتدا ٥ سی سی از محلول ۰/۷٥ درصد کازئین که در آن بافر هیدرو دی سدیم فسفات ٥۰ میلی مولار با پی اچ ۷ به وسیله ی پیش انکوبه گذاری به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه به تعادل دمایی رسید. pH به وسیله ی افزودن آهسته اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال تنظیم گشت. به این سوبسترا حجم مشخصی از آنزیم که با ۱ سی سی بافر فعال سیستئین هیدروکلراید مونوهیدرات ۳۰ میلی مولار در دی سدیم EDTA ٦ میلی مولار، رقیق شده اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب ۳۷ درجه به آرامی مخلوط گردید. با افزودن ٥ سی سی تری کلرواستیک اسید ۳۰ درصد وزنی-حجمی واکنش متوقف شد. سپس در درجه حرارت اتاق سرد و با کاغذ صافی واتمن ٤۲ صاف کرده و جذب در طول موج مرئی-فرابنفش ۲۸۰ اندازه گیری شد(اینگلند و همکاران ۱۹٦۸).

تعیین درجه هیدرولیز آرد به روش اورتوفتالدهید (OPA)

درجه هیدرولیز طبق روش نیلسن و همکاران (۱۹۸٦) انجام گرفت. ابتدا ساخت معرف OPA که ۳/۸۱ گرم دی سدیم تترا بورات + ۰/۱ گرم SDS به ۷٥ سی سی آب مقطر اضافه کرده و سپس ۸۰ میلی گرم اورتوفتالدهید را در ۲ سی سی اتانول ۹٦ درصد به خوبی حل کرده و با مگنت روی شیکر قرار داده تا حل شود. ۰/۲٥ سی سی مرکاپتواتانول را نیز به ظرف اصلی اضافه کرده و سپس حجم با آب مقطر به ۱۰۰ رسانده شد. مرحله بعدی ۰/٥ گرم آرد را در نسبت های مختلف با فعالیت آنزیمی یکسان به علاوه ۱۰ سی سی آب مقطر اضافه کرده و در نمونه ی شاهد به جای آنزیم از آب استفاده کردیم. سپس لوله ها را ۳۰ دقیقه روی شیکر قرار دادیم و سپس ۲۰ دقیقه در دور ۱۰ هزار و دمای ٤ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ کرده و ۰/٤ سی سی را به ۳ سی سی OPA اضافه کرده و بعد با معرف صفر کرده و سپس جذب در ۳٤۰ نانومتر قرائت شد. به نمونه شاهد آنزیم اضافه نگردید. استاندارد مورد استفاده سرین بود.

SRC گندم: این آزمون طبق روش مصوبAACC به شماره ۱۱-٥٦ انجام گردید.

ابتدا رطوبت آرد های موجود را با دستگاه رطوبت سنج اندازه گیری کرده و سپس میکروتیوپ هارا تک به تک وزن کرده و وزن آنها یادداشت شد سپس ۰/۳ گرم آرد را در آنها ریخته و ۱/٥ سی سی حلال را به هر کدام اضافه کرده و یک دقیقه با ورتکس هم زده شد و بعد از آن ٥ دقیقه روی هیتر شیکر با دمای ۲٥ و دورrpm ۱٤۰۰ قرار داده و بعد از آن با سانتریفیوژ با دمای ۲٥ و زمان ۲ دقیقه و دورg٤۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. .سپس مایع رویی را دور ریخته و ۱۰ دقیقه میکروتیوپ ها را برعکس گذاشته که حلال آن کامل خارج شود و بعد از آن میکروتیوپ حاوی رسوب را وزن کرده و وزن آن ها یادداشت شد.

آزمون حلالیت پروتئین

طبق روش مصوب AACC به شماره ٤٦-۲٤ انجام گردید.

ابتدا از هر کدام از نمونه های آرد مقدار ۲ گرم را وزن کرده سپس ۳۰ سی سی آب مقطر را آرام آرام به آن اضافه کرده و توسط استیرر با دورg ۱۱۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه کامل هم زده شد و سوسپانسیون در سانتریفیوژ با دمای ۲٥ و دور rpm ۲۷۰۰ و زمان ۱۰ دقیقه قرار داده شد.

سپس ۰/۱ سی سی از مایع رویی را با ٥ سی سی معرف برادفورد مخلوط کرده و ۲ دقیقه با ورتکس هم زده شد سپس ۲۰ دقیقه در جای تاریک قرار داده و جذب در ٥۹٥ قرائت گردید.

خاصیت امولسیون کنندگی

طبق روش(باربر و همکاران) با تغییرات انجام گرفت. ابتدا ۰/۵ گرم آرد را در ۱۵۰ سی سی آب مقطر حل کرده و در بشری که دو طرف دیواره آن پیچ مسی که یک سطح آن در تماس با سوسپانسیون و قسمت بیرونی آن با استفاده از سوسماری به اهم متر متصل شده است اضافه گردید. ابتدا به مدت یک دقیقه با دورrpm ۸۰۰۰ محلول را هم زده تا یک سوسپانسیون به دست آمد سپس با دورrpm ۷۰۰۰ روغن با سرعت ۱۲ میلی لیتر در ساعت توسط بورت به سوسپانسیون اضافه گشت تا زمانی که میزان مقاومت الکتریکی اندازه گیری شده به وسیله ی اهم متر در اثر معکوس شدن فازها و تبدیل امولسیون روغن در آب به امولسیون آب در روغن به بیشترین مقدار رسید و در این لحظه اهم متر میزان مقاومت را عدد ۱ نشان داد. میزان روغن مصرفی ظرفیت امولسیون کنندگی را نشان داد.(اولادله و آنیا، ۲۰۰۷; لی و همکاران، ۲۰۱۲ ; آمزا و همکاران، ۲۰۱۳).

تعیین ظرفیت آنتی اکسیدانی به روش DPPH

ظرفیت آنتی اکسیدانی طبق روش DPPHاندازه گیری شد. برای اندازه گیری ظرفیت آنتی اکسیدانی نمونه ابتدا عصاره متانولی ساخته شد، برای ساخت این عصاره نمونه را به نسبت ۱ به ۱۰ با متانول ۹۹ درصد مخلوط کرده سپس به مدت ٢٤ ساعت در تاریکی و دمای محیط نگهداری شد. پس از این مدت مایع رویی به مدت ۱۰ دقیقه با دور بالا سانتریفیوژ شده و سپس از این مایع شفاف جهت اندازه گیری خاصیت آنتی اکسیدانی استفاده گردید. برای اندازه گیری خاصیت آنتی اکسیدانی به ازای ٤ سی سی عصاره متانولی از نمونه ها ۲ سی سی محلول متانولی DPPH(۰/۰۰٤) درصد اضافه گردید. سپس محلول حاصل با ورتکس هم زده شد و بعد از ۳۰ دقیقه نگهداری در محل تاریک جذب در طول موجnm ۵۱۷ اندازه گیری شد (راکیس و همکاران ۲۰۰۷).

روش تجزیه و تحلیل آماری نتایج

هر آزمون حداقل در ۲ تکرار انجام گردید و نتایج حاصل با به کار گیری نرم افزار SPSS و با استفاده از جدول آنالیز واریانس (ANOVA) تحلیل شدند. روش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی برای آزمون های این تحقیق استفاده گردید. آزمون مقایسه میانگین در سطح اطمینان ۹۵ درصد و با حداقل تفاوت معنی دار LSD انجام گرفت.

نتایج و بحث

فعالیت آنزیمی

فعالیت آنزیمی پروتئاز استخراجی از آرد گندم سن زده و آرد گندم سالم پس از عبور از فیلتر ۰/٤٥ میکرون، با روش هضم کازئین اندازه گیری شد و نتایج در جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج این مطالعه نشان داد که فعالیت پروتئولیتیکی عصاره آنزیمی آرد سن زده نسبت به عصاره آنزیمی آرد گندم سالم دارای تفاوت معنی داری در سطح اطمینان ۹۵ درصد بود ($p<۰/۰۵$). در ارتباط با تاثیر پروتئولیتیکی آنزیم آرد سن زده مطالعات اندکی انجام گرفته است اما از مقایسه نتایج حاصل از این پژوهش با پروتئاز های گیاهی، چنین استنباط میشود که فعالیت آنزیمی پروتئاز آرد گندم سن زده (سرین) بیشتر از نوع پروتئاز گیاهی (سیستئین) می‌باشد.

جدول۱- مقایسه میانگین فعالیت آنزیمی (unit/ml)

Table 1- Comparison of mean enzymatic activity (unit/ml)

Sample	enzymatic activity
sunn pest flour wheat	68.75 ±1.77[a]
flour wheat healthy	39.5 ± 00 [b]

درجه هیدرولیز

درجه ی هیدولیز بیان کننده ی میزان پروتئولیز پروتئین می‌باشد، که به خاطر شکسته شدن پیوند های پپتیدی هیدرولیز شده اتفاق می‌افتد که در اثر هیدرولیز پپتیدی پروتئین، غلظت گروه های آمین افزایش پیدا می‌کند.

درجه هیدرولیز طبق واکنشگر OPA اندازه گیری شد. به منظور مشخص کردن درجه هیدرولیز پروتئین درآرد گندم، از منحنی استاندارد سرین استفاده شد. نتایج آزمایش درآرد تیمار شده با عصاره آنزیمی سن زده نشان می‌دهد که سن زدگی تاثیر معنا داری بر درجه هیدرولیز دارد. همچنین نتایج آزمایش آرد سالم تیمار شده با آنزیم پروتئاز آرد سن زده نشان می دهد که افزودن آنزیم پروتئاز استخراجی از آرد سن زده باعث شکسته شدن پیوند های پپتیدی و افزایش درجه هیدرولیز نسبت به آرد سالم شد. بانت و همکاران (۲۰۰۵) گزارش کردند که گندم هایی که تحت تاثیر آفت سن قرار گرفته اند درجه هیدرولیز بالاتری نسبت به گندم های سالم داشتند. نتایج جدول شماره (۲) نشان داد که با اضافه کردن ویتامین ث به آرد باعث بهبود شبکه گلوتنی و بهتر شدن کیفیت آرد کیفیت آرد گردید. حروف کوچک غیر یکسان در هر ستون نشان دهنده ی معنی دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد می‌باشد.

جدول ۲- مقایسه میانگین درجه هیدرولیز

Table Number 2- Comparison of average hydrolysis degree

Sample	hydrolysis degree
flour wheat healthy	15.6±0.41[a]
flour wheat healthy +enzymatic extract sunn pest flour wheat	64.15±0.49[b]
flour wheat healthy + vitamin c	13.3± 0.14[c]
flour wheat healthy + enzymatic extract sunn pest flour wheat+ vitamin c	38.93± 0.37[d]

*The large different letters show significant difference (P< 0.05) in Dunkan test.

⁕ The small different letters show significant difference (P> 0.05) in Dunkan test.

SRC

این روش میزان حلال ذخیره شده به وسیله آرد بعد از انجام سانتریفیوژ است که براساس درصد وزن آرد دارای ۱٤ درصد رطوبت بیان می‌شود. این روش یک روش آسان و اقتصادی وکاربردی میباشد. در این پژوهش از حلال اسید لاکتیک که باعث آنالیز بهتر پلیمر های گلوتن می‌شود و حلال آب که روی پروتئین بی تاثیر است استفاده شد. SRC به طور معنی داری با اجزای پلیمری آرد همبستگی دارد.

$$\%SRC = \left(\frac{\text{gel wt}}{\text{flour wt}} \times \frac{86}{100 - \%FM}\right) \times 100$$

Where % FM is the flour moisture.

رام و همکاران (۲۰۰۵) آزمون های SRC را جهت پیش بینی ویژگی های مخلوط آرد گندم به کار بردند. نتایج جدول شماره (۳) نشان داد که آردهای سالم با حلال اسید لاکتیک، SRC بالاتری به دلیل پلیمر های باکیفیت و سالم خود داشتند. در مقابل آرد گندم سن زده با اسید لاکتیک به دلیل فروپاشی شبکه گلوتنی توانایی نگهداری حلال پایینی و در نتیجه SRC پایین تری داشتند. همچنین نتایج حاصل از SRC با حلال آب، در آرد گندم سالم و آرد گندم سن زده یکسان بود زیرا آب روی پنتوزان و نشاسته تاثیر گذار است و هدف از این پژوهش پروتئین (گلوتنین) است. حروف کوچک یکسان در هر ستون نشان دهنده ی عدم معنی دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد است.

جدول ۳- مقایسه SRC در آرد گندم سالم وآرد گندم سن زده

Table 3- Comparison of SRC mean in healthy flour and sunn pest flour wheat

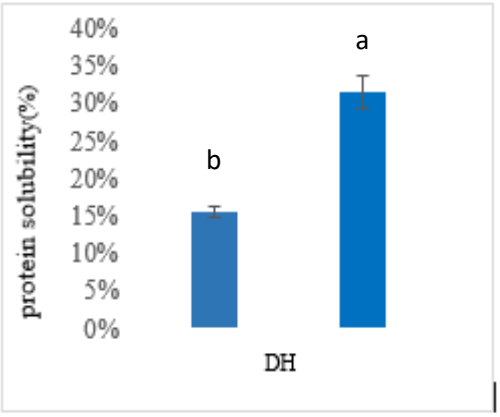
Sample	SRC
healthy flour+ (LASRC)	82.5±0.7[a]
healthy flour+ (WSRC)	68±0[b]
sunn pest flour wheat + (LASRC)	58.25±1.06[c]
sunn pest flour wheat+ (WSRC)	68±0[b]

* The large different letters show significant difference (P<0.05) in Dunkan test.

⁕ The small different letters show significant difference (P> 0.05) in Dunkan test

حلالیت پروتئین

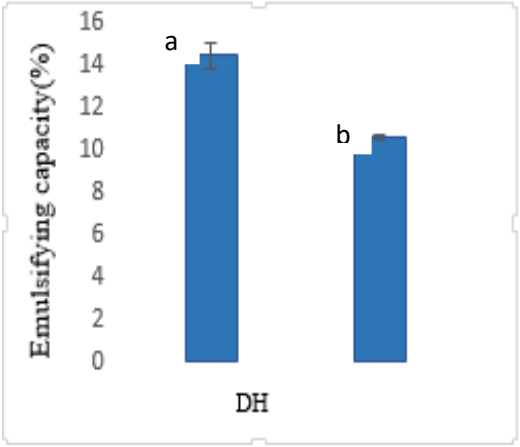
پروتئین ها به صورت گسترده ای در صنعت غذا قابل استفاده هستند اما به علت برخی ویژگی های خاص پروتئینها استفاده از آنها در محصولات مختلف محدود شد که یکی از روش های اصلاح این ویژگی ها هیدرولیز آنزیمی و تبدیل آن به پپتید های کوچک می‌باشد. افزایش درجه هیدرولیز حلالیت پروتئین افزایش پیدا می‌کند حلالیت پروتئین مربوط به بر هم کنش های آبگریز (پروتئین-پروتئین) و آبدوست (پروتئین- حلال) مربوط می‌شود. حلال مورد نظر آب است بنابراین حلالیت پروتئین به عنوان یک خاصیت آبدوستی طبقه بندی می‌شود. بابلر و همکارانش (۲۰۱۶) گزارش نمودند که پروتئین های دست نخورده کمترین انحلال پذیری را دارند. نمودار شماره (۱) نشان داد که با باز شدن رشته های پروتئینی سطح تماس آنها با آب افزایش پیدا می کند و پیوند های آب_پروتئین نیز افزایش پیدا کرده و حلالیت نیز افزایش می‌یابد (یالسین و همکاران، ۲۰۰۸; بابلر و همکاران۲۰۱۶).



شکل۱-حلالیت پروتئین
Figure 1- Protein solubility

امولسیون کنندگی

امولسیون کنندگی از طریق پیوند های شیمیایی متفاوت صورت می گیرد.پیوند هایی که در فرآیند امولسیون کنندگی شرکت می‌کنند پیوند هایی هستند مانند یونی، واندروالسی، قطبی_قطبی و غیره که توسط مولکولهای چربی با بلوکه کردن مکانهایی که برای پیوند آبگریز موجود هستند، آبدوستی سطحی را کاهش می دهد که این امر باعث ایجاد امولسیون کنندگی می‌شود. نتایج نمودار شماره (۲) نشان داد که با افزایش درجه هیدرولیز ظرفیت امولسیون کنندگی کاهش پیدا کرد که دلیل آن این است که افزایش درجه هیدرولیز به دلیل تولید پپتید های با زنجیره کوتاه از قابلیت امولسیون کنندگی کاسته می‌شود زیرا وقتی هیدرولیز صورت می گیرد حلالیت پپتید ها افزایش پیدا کرده و آنها بین فضای آب و روغن قرار گرفته و به دلیل داشتن خصوصیت آبدوستی و چربی دوستی نقش سورفاکتانت را دارند و تا یک درجه هیدرولیز کمی باعث افزایش خاصیت امولسیون کنندگی می‌شوند اما با افزایش درجه هیدرولیز پایداری امولسیون کم شده زیرا پپتید های زیادی با وزن مولکولی کم تولید شده که خاصیت آمفیفیلی ندارند (اولادله و آنیا ۲۰۰۷ ; لی و همکاران ۲۰۱۲; آمزا و همکاران ۲۰۱۳).



شکل ۲- ظرفیت امولسیون کنندگی
Figure 2-Emulsifying capacity

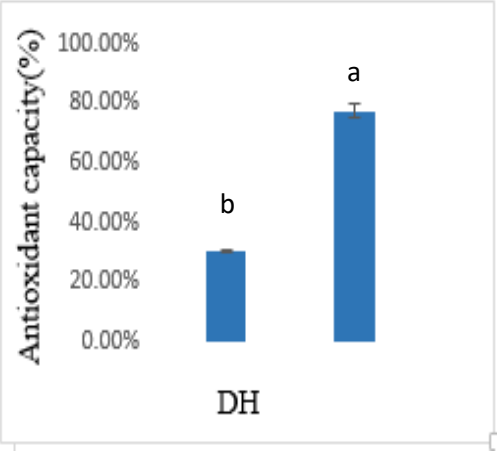
ظرفیت آنتی اکسیدانی

تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی مبتنی بر به دام انداختن رادیکال های آزاد، ترکیب شیمیایی به نام ۲و۲_ دی فنیل۱_ پیکریل هیدرازیل (DPPH) توسط عوامل آنتی اکسیدانی که موجب کاهش میزان جذب در طول موج ۵۲۰ نانومتر میشود. شیما کاوه و همکاران در سال

۱۳۹۸ هیدرولیز پروتئین شنبلیله توسط آنزیم پانکراتین را مورد بررسی قرار دادند که هدف آن تاثیر غلظت آنزیم و دما بر فعالیت مهار DPPH بود که نتیجه گرفتند هیدرولیز پروتئین به میزان قابل توجهی منجر به افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی شد. زمانی که DPPH با موادی که دهنده ی H هستند ترکیب می‌شود فرم احیای رادیکال ایجاد میشود که این عمل موجب کاهش رنگ آن میشود، به طوری که این واکنش رنگ بنفش آن را از بین می‌برد. طبق نمودار شماره (۳) هیدرولیز آنزیمی باعث ایجاد پپتید های آزاد می‌شود که این پپتید ها خاصیت کلاته کنندگی دارند و رادیکال های آزاد را به دام میندازند که باعث افزایش خاصیت آنتی اکسیدانی می‌شود.

درصد آنتی اکسیدانی=

۱۰۰× (جذب کنترل /جذب نمونه _ جذب کنترل)

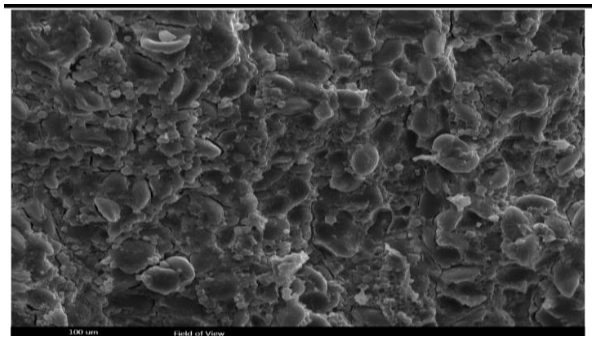


شکل۳ -ظرفیت آنتی اکسیدانی

Figure 3- Antioxidant capacity

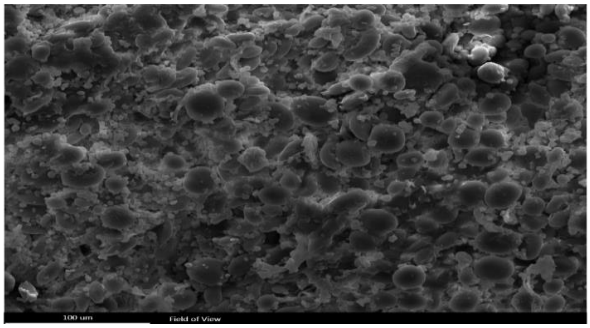
SEM

گلوتن توسط پیوندهای کوالانسی مانند دی سولفیدی، و پیوند های غیر کولانسی (هیدروژنی، یونی، هیدروفوبی) ساخته شده است. با مکانسیم هیدرولیز و تاثیر آنزیم های هیدرولیتیک مانند پروتئاز، پپتیداز، آلکالاز، زایلاناز، پنتوزاناز و سلولاز) بر ویژگی های رئولوژیکی، عملکردی، ساختاری و تغذیه ای گلوتن و خمیر می‌پردازد. به طور کلی پروتئاز و پپتیداز به صورت کاملا مستقیم بر پیوند های پپتیدی گلوتن تاثیر می‌گذارند و پنتوزان و سلولز به ترتیب تحت تاثیر زایلاناز، پنتوزاناز و سولاز قرار میگیرد و این آنزیم ها به صورت غیر مستقیم روی گلوتن تاثیر گذار هستند. هیدرولیز پروتئین توسط آنزیم، به گلوتن این امکان را می‌دهد تا در اهداف مختلف و در صنایع غذایی و غیر غذایی به کار برده شود (پورمحمدی و عابدی ۲۰۲۱). تصاویر زیر مقایسه ی ماتریکس پروتئینی گندم سن زده و سالم را نشان می‌دهد. در گندم سن زده، مشاهده شده است که آفت سن شبکه گلوتنی را تخریب کرده و به صورت قابل توجهی شاخص گلوتن را تحت تاثیر قرار داده است که این عمل باعث تغییر ترکیب شبکه گلوتنی شده است. فرآیند پروتئولیز پیوند های گلوتنین و گلیادین را تخریب می‌کند اما بیشترین تخریب مربوط ب گلیادین با وزن مولکولی کمتر از ۷۵ کیلو دالتون است. این تصاویر به صورت کاملا واضح نمایانگر تخریب گویچه های پروتئینی توسط حشره سن می‌باشند (تورابیکا و همکاران ۲۰۱٤).



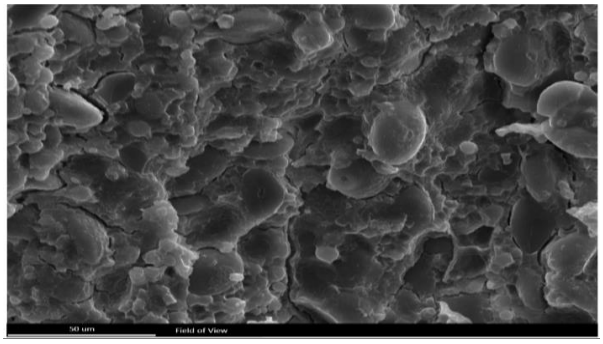
شکل۴ -گندم سن زده با بزرگنمایی ۲۵۰ x

Figure4- aged wheat with magnification of 250 X



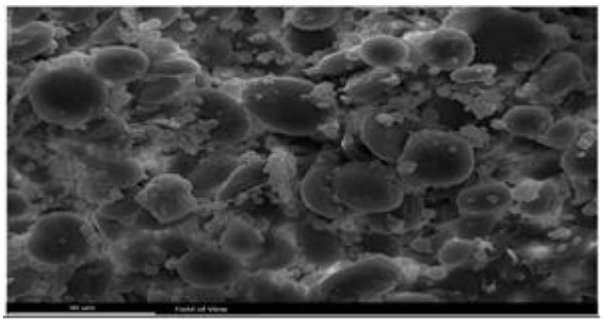
شکل۵- گندم سالم با بزرگنمایی ۲۵۰ x

Figure5- healthy wheat with magnification of 250 X



شکل۶ -گندم سن زده با بزرگنمایی۵۰۰ x

Figure6- Aged wheat with magnification of 500 X



شکل ۷- گندم سن زده با بزرگنمایی ۵۰۰ x

Figure7- Aged wheat with magnification of 500 X

نتیجه گیری

با بررسی و مقایسه نتایج حاصل از استفاده آنزیم در پژوهش حاضر و دیگر پژوهش های مشابه نشان می‌دهد که پروتئاز گندم سن زده یک پروتئاز مناسب از آرد گندم سن زده است که به عنوان محصولی با ارزش افزوده به دلیل تولید پپتید های کوتاه زنجیر با خواص با خواص عملکردی مفید مانند آنتی اکسیدانی، ضد دیابت، ضد فشار خون،.. اشاره می‌شود. به علاوه این مطالعه مشخص گردید که به طور کلی از مزایای استفاده از پروتئاز سن، ارزان بودن و قابل دسترس بودن گندم سن زده و هیدرولیز بالای آن می‌باشد.

منابع مورد استفاده

کیومرثی م، کدیور م، زارعی س و طالبی م، ۲۰۱۷. بررسی خواص کیفی، عملکردی و زیست‌فعالی در گندم سن‌زده. پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی, ۵(٤), ۳۹٤-۳۸۳.

نجفی میرک ت، نجفیان گ، خرسندی ه، معین نمینی س و شرفی گ، ۱۳۹۲. اثر سن زدگی دانه بر کیفیت نانوایی ارقام گندم نان. مجله به زراعی نهال و بذر (نهال و بذر)، ۲۹(۲), ٤۲۷-٤۱۳.

Akić, S, Petrović S, Kukić J, Jadranin M, Tešević V, Povrenović D and Šiler-Marinković S, 2007. Influence of thermal treatment on phenolic compounds and antioxidant properties of oak acornsom Serbia. Food Chemistry 104(2): 830-834.

Alcin E, Sakiyan O, Sumnu G, Celik S and Koksel H, 2008 . Functional properties of microwave- w treated heat gluten. European Food Research and Technology 227(5): 1411-1417.

Aluko R and Monu E, 2003. Functional and bioactive properties of quinoa seed protein hydrolysates. Journal Food Science 68:1254-1258.

Amza T, Balla A, Tounkara F, Man L and Zhou HM, 2013. Effect of hydrolysis time on nutritional, functional and antioxidant properties of protein hydrolysates prepared from gingerbread plum (Neocarya macrophylla) seeds. International Food Research Journal 20(5): 2081-2090.

Bonet A, Caballero PA, Gómez M and Rosell CM, 2005. Microbial transglutaminase as a tool to restore the functionality of gluten from insect damaged wheat. Cereal Chemistry 82(4): 425-430.

Bubler S, Rumpold BA, Jander E, Rawel HM and Schlüter OK, 2016 . Recovery and techno-functionality of flours and proteins from two edible insect species: Meal worm (Tenebrio molitor) and black soldier fly (Hermetia illucens) larvae. Heliyon 2(12): 1-23.

Englund PT, King TP, Craig LC and Walti ANDA, 1968 . Ficin. Its isolation and characterization. Biochemistry 7(1): 163-175.

Korhonen H and Pihlanto A, 2006. Bioactive peptides: production and functionality. International Dairy Journal 16(9): 945-960.

Li X, Xiong H, Yang K, Peng D, Peng H and Zhao Q, 2012 . Optimization of the biological processing of rice dregs into nutritional peptides with the aid of trypsin. Journal of food science and technology 49(5): 537-546.

Oladele AK and Aina JO, 2007 . Chemical composition and functional properties of flour produced from two varieties of tigernut (Cyperus esculentus). African Journal of Biotechnology 6(21): 1-10.

Pourmohammadi K and Abedi E, 2021. Hydrolytic enzymes and their directly and indirectly effects on gluten and dough properties: An extensive review. Food Science & Nutrition 437-449.

Ram S, Dawar V, Singh RP and Shoran J, 2005. Application of solvent retention capacity tests for the prediction of mixing properties of wheat flour. Journal of Cereal Science 42(2): 261-266.

Salas CE, Dittz D and Torres MJ, 2018 . Plant proteolytic enzymes: Their role as natural pharmacophores. In Biotechnological applications of plant proteolytic enzymes Springer. Cham 107-127.

Torbica AM, Mastilović JS, Pojić MM and Kevrešan ŽS, 2014 . Effects of wheat bug (Eurygaster spp and Aelia spp) infestation in preharvest period on wheat technological quality and gluten composition. The

Scientific World Journal 232-241.

Wang CC and Grant DR, 1969. The proteolytic enzymes in wheat flour. Cereal Chemistry 46: 537-544.

Journal of Food Research, 2022,32(4):75-85
https://foodresearch.tabrizu.ac.ir

© 2009 Copyright by Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
This is an open access article under the CC BY NC license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/)
DOI: 10.22034/FR.2022.49947.1820

Evaluation of functional properties of peptides obtained from hydrolysis of healthy wheat flour protein by sunn pest protease

M Yari[1], M Hosseini*[2] and M Kadivar[3]

Received: January 17, 2022 Accepted: July 26, 2022
[1] Master of Food Science and Engineering, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology
[2] Assistant Professor of Food Science and Engineering, Faculty of Agriculture, Ilam University
[3] Professor Department of Food Science and Engineering, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology
*Correspondence author: Email: m.hosseini@ilam.ac.ir

Introduction: Wheat is the most important sustainable food product for more than a third of the world's population and has more calories and protein than other cereal products in the world diet.
The main property that distinguishes it from other products is the unique properties of the resulting dough, which allows it to appear in a variety of breads and other food products such as cakes, biscuits and pasta. These properties in these products depend on the structures and interactions of the grain storage proteins, which together constitute the gluten protein. Lutein is the predominant carotenoid in wheat. Wheat bran and sprouts contain a lot of carotenoids and antioxidant activity compared to endosperm. Lutein along with zeaxanthin is important for human skin and eye health. Heart disease protection may come from whole grains, antioxidants, vitamins, and fiber and minerals. Whole grains are also effective in preventing diabetes. Whole grains appear to protect against heart disease and cancer. Proteins in plant tissue are simple and consist of four main types, including: albumin (soluble in water and dilute buffer), globulins (soluble in salt water) and prolamine (soluble in 90-90% ethanol) and glutlin (soluble in Wheat gluten protein is classically composed of two parts: alcohol-soluble gliadin and alcohol-insoluble glutenin. Glutenins are known as the largest polymers in nature. Wheat proteins can be divided into structural proteins (gluten-free) and storage proteins or (gluten). Structural proteins include albumin, globulin, and amphiphilic. Non-membrane amphiphilic proteins have many effects on grain hardness and rheological properties of dough. Wheat storage proteins are known as prolamins due to their amino acids proline and glutamine. Aqueous salivary secretions act rapidly on the plant cell, first increasing cell respiration and then causing the protoplasm to flow, which is usually due to increased permeability of the cell membrane. They contain soluble amino acids that immediately after secretion on plant materials with the formation of a large number of hydrogen bonds as well as a number of disulfide bonds in the form of gels that gradually become solid. In this study, the effect of extracted protease from aged wheat, protease (serine) has been investigated. The aim of this study was to produce short chain peptides with beneficial functional and therapeutic properties such as antioxidant, antidiabetic, anti-hypertension by aged wheat protease.

Material and methods: The tests include determination of enzymatic activity, degree of hydrolysi, determination of functional properties such as solubility, antioxidant, emulsification, and solvent retention capacity (SRC). Microstructure of the contaminated seed was also investigated by electron microscopy (SEM). Statistical analysis was performed using SPSS software at 95% confidence level. First, for extraction of aged wheat flour mix 2 gr of flour with 10 cc of 0.2 M acetate buffer with pH = 3.8 and centrifuge for 5 minutes. The supernatant was separated and filtered from a 0.45 microfilter and stored in the freezer. flour enzymatic activity was performed in the first, 5 cc of 0.75% casein solution in which 50 mM hydrodisodium phosphate buffer with pH= 7 is equilibrated for 10 minutes at 37 ° C by pH. Slow addition of 0.1 N hydrochloric acid is adjusted to this substrate. To this substrate a certain volume of enzyme is diluted with 1 cc of active buffer of 30 mM cysteine hydrochloride monohydrate in 6 mM EDTA and diluted in a bath for 10 minutes and water 37 °C is mixed gently. The reaction is then stopped by adding 5 cc of 30% v / v trichloroacetic acid. At room temperature, cool with Whatman 42 filter paper and measure the absorption at 280 nm visible-ultraviolet wavelengths. For hydrolyse degree, First, make an opa reagent that dissolves 3.81 g of disodium tetra borate + 0.1 g of SDS plus 75 cc of distilled water, then dissolve 80 mg of orthophthaldehyde in 2 cc of 96% ethanol and place it on the shaker with a magnet until to be solved. Add 250 microliters of mercaptoethanol to the main container and then increase the volume to 100 with distilled water. The next step is to add 0.5 g of flour in different proportions with the same enzymatic activity plus 10 cc of distilled water and in the control sample we used water instead of enzyme. Then we put the tubes on the shaker for 30 minutes and then centrifuge for 20 minutes at 10,000 rpm and 4 ° C and add 400 µl to 3 ml of opa and then zero with reagent and then absorb at 340 nm. we read. Also, the effect of this protease enzyme on functional properties and creation of free peptides was investigated.

Results and discussion: It was observed that the enzyme extracted from aged wheat performed better in the creation of free peptides and increased the functional properties such as antioxidant properties and solubility, but the emulsifying properties of healthy flour from flour with aged enzymatic extract increased due to lower hydrolysis of healthy flour than healthy flour with aged enzyme. Wheat SRC was carried out according to AACC no. 11-56 method with two solvents of water and lactic acid, the results of which indicated that by increasing hydrolysis, SRC decreased in lactic acid solvent and was ineffective in water solvent. In addition, electron microscopy (SEM) with a magnification of 100 and 50 µm was observed that in aged wheat, protein structure was degraded compared to healthy wheat and protein cells were partially destroyed. These peptides are very beneficial for human health and are used in food industry and various food products.

Conclusion: The results of this study showed that the use of protease enzyme of sunn pest flour wheat enzyme extract in the production of free peptides has worked well and also has been very effective in improving functional properties such as solubility, antioxidants. Continuous innovations in the food industry and their higher quality requirements force the food industry to produce flours with specific functional properties. It seems protease isolated from sunn pest wheat flour might be considered as a suitable source for creating peptides with several advantages. According to the results, it was observed that aged wheat protease is a suitable animal protease for peptides with beneficial health benefits. In this study, it was found that in general, the advantages of age protease are the cheapness and availability of aged wheat and its high hydrolysis.

Keywords: Serine protease, Bioactive peptide, Functional property, Solvent retention capacity