www.journals.rifst.ac.ir
نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی
سال ۱۳۹۵، جلد ۵، شماره ٤، صفحات ۳۹٤-۳۸۳

JRIFST

بررسی خواص کیفی، عملکردی و زیست‌فعالی در گندم سن‌زده

مریم کیومرثی[1*]، مهدی کدیور[2]، سیدرضا زارعی[3]، مجید طالبی[4]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی، اصفهان
* نویسندهٔ مسئول (maryam_kiumarsi@yahoo.com)
۲- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی، اصفهان
۳- استادیار، گروه شیمی و بیوشیمی، دانشگاه استرالیای غربی، پرت، استرالیا
۴- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی، اصفهان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۱/۳۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۷/۱۷

واژه‌های کلیدی
پپتیدهای زیست‌فعال
خواص عملکردی
درجهٔ هیدرولیز
گندم سن‌زده

چکیده

باوجود تمام پیشرفت‌های حاصله در زمینهٔ کنترل آفت‌ها، سن همچنان در اکثر مناطق کشت گندم ایران یک آفت خطرناک محسوب می‌شود. این حشره با هیدرولیز پروتئین‌ها توسط پروتئیناز بزاق خود باعث ایجاد خصوصیات ضعیف رئولوژیکی و تولید نان با حجم کم و بافت نامناسب می‌گردد. ازطرفی هیدرولیز پروتئین‌ها می‌تواند در بهبود خواص عملکردی، تولید پپتیدهای زیست‌فعال و بهبود سیستم فیزیولوژیک بدن نقش مؤثری داشته باشد. در این تحقیق، ابتدا نمونه‌های گندم با درصدهای مختلف سن‌زدگی (۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد) تهیه گردید و آزمون‌های مختلف جهت بررسی اثر سن‌زدگی بر ویژگی‌های کیفی، عملکردی و زیست‌فعالی گندم انجام گرفت. نتایج آزمون‌های کیفی آرد نشان داد که با افزایش درصد سن‌زدگی، عدد زلنی کاهش یافت که نشان‌دهندهٔ کیفیت پایین گلوتن و درنتیجه نامناسب بودن آرد به‌منظور تولید نان می‌باشد. ازطرف‌دیگر با افزایش درصد سن‌زدگی، درجهٔ هیدرولیز در نمونه‌ها افزایش یافت که به تبع آن، تغییراتی در روند خواص عملکردی نظیر حلالیت و امولسیون‌کنندگی دیده شد. با افزایش درصد سن‌زدگی، حلالیت نمونه‌ها افزایش یافت و خاصیت امولسیون‌کنندگی در گندم تا سن‌زدگی ۲۵ درصد بیشترین مقدار بوده اما با افزایش درصد سن‌زدگی، این ویژگی کاهش یافت. نتایج بررسی ویژگی‌های زیست‌فعالی نمونه‌ها نشان داد که در نتیجهٔ افزایش درصد سن‌زدگی، پپتیدهای کوتاه‌زنجیر با خاصیت بازدارندگی آنزیم ACE و آنتی‌اکسیدانی تولید شد، به‌طوری‌که این دو خاصیت در گندم کاملاً سن‌زده بیشترین و در گندم سالم کمترین مقدار بود.

مقدمه

سن گندم مهمترین آفت موجود در ایران و کشورهای منطقه است و باوجود تمام پیشرفت‌های حاصله در زمینهٔ کنترل آفت‌ها، سن در اکثر مناطق کشت گندم هنوز هم یک آفت خطرناک است و بروز خشکسالی در سالهای اخیر باعث گسترش خسارت سن گندم شده است. در منطقهٔ خاورمیانه، سن‌زدگی گندم در ایران به مراتب بیشتر از کشورهای منطقه است. به‌طوری‌که سطح مناطق آلوده به سن در خاورمیانه حدود ۵/۴ میلیون هکتار است که حدود ۳ میلیون هکتار آن مربوط به ایران می‌باشد (خانجانی، ۱۳۸۱). این آفت‌ها مجموعه‌ای از گونه‌های متعلق به دو خانوادهٔ بسیار نزدیک به نام‌های *Pentatomidae* و *Scutelleridae* هستند که دو جنس مهم در این خانواده‌ها *Aelia* (متعلق به *Pentatomidae*) و *Eurygaster* (متعلق به *Scutelleridae*) می‌باشند. دررابطه‌با مطالعه‌هایی که

روی *Nysius huttoni* انجام شده است، آنزیم تزریق‌شده از این آفت در دانه، یک پروتئاز قلیایی محلول در آب با فعالیت بهینه در pH: ۹ و دمای ۴۰-۳۵ درجهٔ سانتی‌گراد است. فعالیت این آنزیم در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد در محدودهٔ pH:۴/۵-۱۱ پایدار است این آنزیم از دستهٔ سرین پروتئازها[1] است و در دمای ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه پایدار است. آثار سن بر ترکیبات شیمیایی و نیز ساختار اندوسپرم نشان می‌دهد ساختمان دانه‌های سالم از استحکام بیشتری در مقایسه با نوع آسیب‌دیدهٔ آن برخوردار است (Every *et al.*,1992). این پدیده به‌طور شدیدی بر خواص رئولوژیکی نیز مؤثر است. خمیر حاصل از گندم سن‌زده بسیار نرم و چسبنده است و نان حاصل حجم کمتری دارد، همچنین سطح پوستهٔ این نان و بافت مغز نیز سفت‌تر می‌باشد (افسریان و همکاران، ۱۳۸۵). مطالعه‌های متعددی دربارهٔ گندم سن‌زده انجام شده است. Bonet و همکاران (۲۰۰۵) بیان کردند که در طی انکوباسیون گلوتن گندم سالم، افزایش اندکی در میزان ترکیبات پروتئینی محلول ایجاد می‌شود اما برخلاف آن، افزایش قابل توجهی در مقدار پروتئین‌های محلول در آب پس از اینکوباسیون گلوتن گندم آسیب‌دیده توسط سن دیده شد. نتایج Kong و همکاران (۲۰۰۷) نشان داد که هیدرولیز گلوتن گندم توسط آنزیم آلکالاز در مقایسه با آنزیم‌های تجاری دیگر نظیر تریپسین[2]، پپسین[3] و پانکراسین[4] تأثیر بیشتری بر افزایش درجهٔ هیدرولیز داشت و ویژگی و نحوهٔ اثر این آنزیم تجاری تا حدود زیادی مشابه پروتئاز مترشحه از بزاق سن می‌باشد. Aja و همکاران (۲۰۰۴) آسیب گندم به‌وسیلهٔ گونه‌های Aelia و Erygaster و تأثیر آن روی گلوتن و درنهایت ویژگی‌های ترکیبات محلول در آب آزادشده حین هیدرولیز را بررسی کردند. طبق گزارش آنها میزان آسیب به مرحله‌ای از رسیدگی و بلوغ که دانه‌ها در آن قرار دارند بستگی دارد که نتیجهٔ آن کاهش شدید و یا خفیف در کیفیت خواص نانوایی است. ترکیبات محلول پس از هیدرولیز شامل پپتون، پپتید، آمینواسیدها و نیز پروتئین‌ها با دامنهٔ گسترده‌ای از وزن مولکولی هستند. پپتیدهای زیست‌فعال[5] می‌توانند از محصولات هیدرولیز گندم به‌وسیلهٔ آفت سن باشند. این پپتیدها که حاصل از هیدرولیز پروتئین‌های گوناگون هستند، امروزه اهمیت بسیاری پیدا کرده‌اند و شامل تعداد محدودی آمینواسید (بین ۱۶-۳) و وزن مولکولی کمتر از ۶۰۰۰ دالتون می‌باشند که به واسطهٔ کوتاهی قادرند وارد رگ‌های خونی شوند و تأثیر مثبت مستقیم بر ارگان‌های بدن داشته باشند به‌طوری‌که تحقیق‌ها نشان داده است این پپتیدها اثرات ضدمیکروبی، ضدفشارخونی، آنتی‌اکسیدانی، ضدچاقی، تنظیم ایمنی بدن، کاهش کلسترول خون، افزایش جذب املاح، ضدانعقادخون و فعالیت شبه مخدری دارند (Korhonen *et al.*, 2006). شیرگاو، پنیر و محصولات لبنی بزرگ‌ترین منابع پروتئین و پپتیدهای زیست‌فعال هستند. همچنین این پپتیدها را می‌توان از منابع گیاهی و حیوانی دیگر نظیر گوشت، ژلاتین، تخم‌مرغ، انواع ماهی، گندم، ذرت، لوبیا، برنج، قارچ، کدو و سورگوم جدا نمود (Wang *et al.*, 2005). Olance و همکاران (۲۰۱۰) در تحقیق خود ویژگی‌های عملکردی گلوتن هیدرولیزشده به‌وسیلهٔ پروتئاز خالص‌سازی‌شده آفت سن (گونهٔ Eurygaster) را بررسی کردند و نتایج نشان داد که حلالیت، ظرفیت امولسیون‌کنندگی و کف‌کنندگی با افزایش درجهٔ هیدرولیز تا ۵ درصد افزایش یافت.

اهداف اصلی این تحقیق، اندازه‌گیری و ارزیابی ویژگی‌های کیفی آرد گندم سن‌زده و مقایسه با نوع سالم آن، بررسی و ارزیابی خواص عملکردی و همچنین ویژگی‌های زیست‌فعالی در گندم با درصدهای مختلف سن‌زدگی به‌منظور استفادهٔ اقتصادی از آن به‌عنوان محصولی با ارزش‌افزوده است.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از گندم سن‌زدهٔ مرجوعی (بیشتر از ۵ درصد) موجود در ادارهٔ غله استان اصفهان استفاده شد که گندم‌های سن‌زده از نوع سالم آن جدا شده و برای تهیهٔ نمونه‌ها، به نسبت‌های مشخص با نوع سالم همان

[1] Serine Protease
[2] Trypsin
[3] Pepsin
[4] Pancreatic
[5] Bioactive peptides

گندم مخلوط و در مراحل مختلف مورد استفاده قرار گرفت. تیمارهای درنظر گرفته‌شده در این پژوهش، گندم کاملاً سالم و گندم با میزان سن‌زدگی ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد بود که توسط آسیاب قهوه (Kenwood مدل CG 100 ساخت چین)، آردگندم تهیه و در آزمون‌ها مورد استفاده قرار گرفت. مواد شیمیایی با درجهٔ خلوص مناسب برای آزمون‌های شیمیایی از شرکت‌های زیگما امریکا و مرک آلمان تهیه شد.

آزمون‌های شیمیایی اندازه‌گیری عدد زلنی

آزمون عدد زلنی، با استفاده از روش مصوب AACC به شماره ۶۱A-۶۵ انجام گردید (AACC, 2003).

درجهٔ هیدرولیز گلوتن[1]

اندازه‌گیری درجهٔ هیدرولیز گلوتن براساس روش واکنش‌گر ارتوفتال‌دی‌آلدئید[2] براساس گزارش Nielsen و همکاران (۲۰۰۱) با اندکی تغییرات انجام گرفت. ابتدا ۳/۸۱ گرم دی‌سدیم‌تترابورات‌دکاهیدرات[3] (Borax) و ۱۰۰ میلی‌گرم سدیم‌دودسیل‌سولفات[4] (SDS) در آب دیونیزه کاملاً حل شد، سپس ۸۰ میلی‌گرم اورتوفتال‌دی‌آلدئید ۹۷ درصد در ۲ میلی‌لیتر اتانول حل شد و به آب دیونیزه انتقال یافت. ۰/۲۵ میلی‌لیتر بتامرکاپتواتانول[5] به این محلول اضافه شد و حجم محلول با آب دیونیزه به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. این محلول در روز آزمایش تهیه شد. ۱ گرم از هر نمونهٔ آرد در ۳۰ میلی‌لیتر آب‌مقطر ریخته و سپس روی هم‌زن مغناطیسی به مدت ۳۰ دقیقه هم‌زده شد و پس از آن به مدت ۲۰ دقیقه در سانتریفیوژ یخچال‌دار (Z36 HK، آلمان) با دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد و دور ۱۲۰۰۰g× سانتریفیوژ گردید. ۰/۴ میلی‌لیتر از سوپرناتانت حاصل از سانتریفیوژ به ۳ میلی‌لیتر از محلول فوق اضافه و میزان جذب ۲ دقیقه بعد در طول موج ۳۴۰ نانومتر در اسپکتروفتومتر (UV/Vis مدل ۲۱۰۰، یونیکو امریکا) خوانده شد. نتایج گروه‌های آمین آزاد در برابر منحنی استاندارد سرین محاسبه شد. جذب نمونه در معادلهٔ منحنی گذاشته شد و با اعمال ضریب، میکروگرم گروه‌های آمین آزاد در کل نمونه محاسبه شد (رابطهٔ ۱ و ۲).

رابطهٔ (۱)

$$\text{درجه هیدرولیز} = h/h_{tot} \times 100$$

رابطه (۲)

$$h = (\text{Serine-}NH_2\text{-}\beta)/\alpha$$

لازم به ذکر است که میزان α، β و h_{tot} برای گلوتن به ترتیب، ۱، ۰/۴ و ۸/۳ می‌باشد.

اندازه‌گیری خواص عملکردی

حلالیت

حلالیت در دامنهٔ pH: ۲-۱۰ برای نمونه‌های گندم با درصد سن‌زدگی ۱۰۰، ۷۵، ۵۰، ۲۵ و گندم سالم اندازه‌گیری شد. بدین‌ترتیب که میزان ۱ گرم از هر نمونه در ۶۰ میلی‌لیتر آب‌مقطر حل و سپس pH به‌وسیلهٔ NaOH ۰/۱ مولار و HCl با استفاده از pH متر تنظیم گردید و مخلوط حاصل به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق با هم‌زن مغناطیسی هم‌زده شد و سپس توسط سانتریفیوژ به مدت ۲۰ دقیقه و دور g× ۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد. پس از جمع‌آوری سوپرناتانت[6]، میزان ۲۵ میلی‌لیتر از آن برای اندازه‌گیری پروتئین محلول به دستگاه هضم کلدال منتقل و پس از آن مراحل تقطیر و تیتراسیون انجام گردید و درصد نیتروژن محلول از رابطهٔ (۳) محاسبه شد (AACC, 2003).

رابطهٔ (۳)

$$\text{درصد نیتروژن محلول} = \frac{\text{نرمالیته اسید مصرفی} \times \text{حجم اسید مصرفی برای نمونه} \times ۰/۰۱۴}{\text{راندمان} \times \text{وزن نمونه}} \times ۱۰۰$$

اندازه‌گیری فعالیت امولسیون‌کنندگی

خصوصیت یادشده با اندکی تغییر مطابق روش Barber و همکاران، (۱۹۸۲) اندازه‌گیری شد و درنهایت ظرفیت امولسیون‌کنندگی آرد گندم به‌صورت میلی‌لیتر روغن مصرفی به‌ازای ۰/۵ گرم پروتئین آرد گزارش شد.

[1] Degree of Hydrolysis
[2] OrthoPhetal di Aldehyde
[3] *di*-Sodium tetraborate decahydrate
[4] Sodium dodecyl sulfate
[5] β-Mercaptoethanol
[6] Supernatant

اندازه‌گیری ویژگی‌های پپتیدهای زیست‌فعال

اندازه‌گیری فعالیت بازدارندگی آنزیم ACE[1]

این آزمایش با استفاده از روش Nejati و همکاران (۲۰۱۳) انجام شد. در ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه با غلظت ۰/۲ درصد وزنی-حجمی پروتئین و ۲۰ میکرولیتر آنزیم ۱۵ میلی‌یونیت‌مولار را در یک لوله اپندورف ریخته و به مدت ۱۰ دقیقه مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شد. ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترای FAPGG[2] ۰/۵ میلی‌مولار را به‌عنوان سوبسترا در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری کرده و سپس به مخلوط نمونه و آنزیم اضافه شد و پس از ۵ دقیقه با استفاده از اسپکتروفتومتر جذب آن در ۳۴۰ نانومتر قرائت شد. مجدداً سل‌ها در انکوباتور گذاشته شد و پس از ۲۵ دقیقه جذب خوانده شد. لازم به ذکر است که پس از تهیهٔ نمونه‌ها و جمع‌آوری سوپرناتانت حاوی پروتئین، به‌منظور حذف تمامی ذرات و کاهش خطای آزمایش، از فیلتر سرسرنگی استفاده گردید. هیدرولیز سوبسترای FAPGG توسط آنزیم ACE، کاهش جذب را به دنبال خواهد داشت. محاسبهٔ درصد بازدارندگی ACE نیز از رابطهٔ (۴) به‌دست آمد.

رابطهٔ (۴)

درصد بازدارندگی ACE=

$(Abs_{nonsample}-Abs_{sample}/Abs_{nonsample}) \times 100$

$Abs_{nonsample}$ جذب مخلوط آنزیم و سوبسترا بدون نمونه‌های هیدرولیزشده (نانومتر) و Abs_{sample} جذب مخلوط آنزیم و سوبسترا با حضور نمونه‌های هیدرولیزشده (نانومتر) می‌باشد.

خاصیت آنتی‌اکسیدانی

این خاصیت با دو مدل سیستم کلاته کردن رادیکال آزاد DPPH و رادیکال OH اندازه‌گیری شد:

خاصیت آنتی‌اکسیدانی ازطریق تأثیر بر رادیکال DPPH

این آزمایش براساس روش Zhu و همکاران (۲۰۰۶) با اندکی تغییرات انجام شد. ابتدا ۲ میلی‌لیتر ۲و۲دی‌فنیل-۱-پیکریل‌هیدرازیل[3] (DPPH) ۰/۱ میلی‌مولار در متانول ۹۵ درصد حل گردید و سپس ۲ میلی‌لیتر از نمونه که حاوی ۰/۲ درصد وزنی-حجمی پروتئین است به آن اضافه شد. مخلوط به خوبی هم‌زده شد و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد و پس از آن جذب در ۵۱۷ نانومتر خوانده شد.

خاصیت آنتی‌اکسیدانی ازطریق کلاته کردن رادیکال OH

در این آزمایش ابتدا ۴ میلی‌لیتر از محلول ۱/۵ میلی‌مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر محلول ۶ میلی‌مولار و ۱/۲ میلی‌لیتر از محلول سدیم‌سالیسیلات ۲۰ میلی‌مولار با هم مخلوط شدند. سپس ۰/۴ میلی‌لیتر از نمونه که حاوی ۰/۲ درصد وزنی-حجمی پروتئین بود، به آن اضافه و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شد و جذب نمونه‌ها در ۵۶۲ نانومتر خوانده شد (Mahady *et al*., 2008).

لازم به ذکر است که درصد خاصیت آنتی‌اکسیدانی در دو روش با رابطهٔ (۵) محاسبه شد.

رابطهٔ (۵)

درصد آنتی‌اکسیدانی =

۱۰۰×(جذب کنترل/جذب نمونه- جذب کنترل)

طرح آماری مورد استفاده و روش آنالیز نتایج

تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها در قالب طرح فاکتوریل کاملاً تصادفی با سه تکرار (به‌جز آزمون حلالیت) انجام شد. تجزیهٔ واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS بررسی شد. برای مقایسهٔ میانگین تیمارها از آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال ۵ درصد استفاده گردید. رسم شکل‌ها با استفاده از نرم‌افزار EXCEL انجام گرفت.

نتایج و بحث

عدد زلنی

آزمون زلنی یا سدیمانتاسیون[4] تابعی از کیفیت گلوتن آرد است. این آزمون براین‌اساس استوار است که گلوتن موجود در آرد آب جذب می‌کند و چنانچه مقداری محلول اسیدلاکتیک و ایزوپروپانول با غلظت

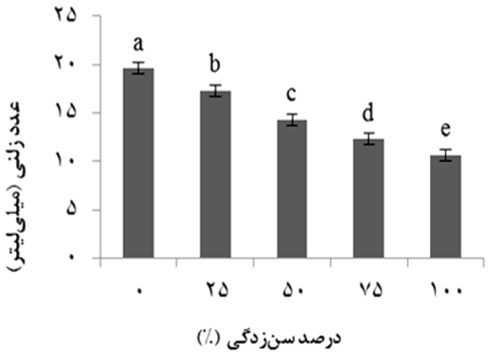
[1] Angiotensin- Converting Enzyme

[2] N-[3-(2-furyl)acryloyl]L-phenylalanylglycylglycine

[3] 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

[4] Sedimentation

معینی به آن اضافه شود، متورم می‌گردد. این میزان تورم به کیفیت گلوتن بستگی دارد. گلوتن مرغوب مقدار بیشتری آب جذب می‌کند و بنابراین بیشتر از گلوتن نامرغوب متورم می‌گردد و درنتیجه حجم رسوب زیادتر است. در ارزیابی عدد زلنی، رسوب بیشتر از ۴۰ میلی‌لیتر خیلی خوب، رسوب ۳۰ تا ۴۰ میلی‌لیتر خوب، رسوب ۲۰ تا ۲۹ میلی‌لیتر متوسط و رسوب کمتر از ۲۰ میلی‌لیتر ضعیف می‌باشد (پایان، ۱۳۸۰). نتایج (شکل ۱) نشان می‌دهد که آرد گندم سالم بیشترین مقدار عدد زلنی و آردگندم کاملاً سن‌زده کمترین مقدار را داراست. Aja و همکاران، (۲۰۰۴) بیان کردند خمیر حاصل از گندم سن‌زده بسیار نرم و چسبنده است که نتیجهٔ تزریق آنزیم پروتئولیتیکی[1] به‌وسیلهٔ آفت سن می‌باشد که منجر به هیدرولیز پروتئین‌های گندم و درنتیجهٔ آن، افزایش مقدار پروتئین‌های محلول شده و از انسجام گلوتن کاسته می‌شود. Torbica و همکاران (۲۰۰۷) بیان کردند که با افزایش ۳/۱ درصد در سن‌زدگی، عدد زلنی تا ۱۵ درصد کاهش می‌یابد. نتایج Matsoukas و همکاران (۱۹۹۰) هم نشان‌گر رابطهٔ عکس بین میزان سن‌زدگی و عدد زلنی بود.



شکل ۱ - تأثیر سطوح مختلف سن‌زدگی گندم بر میزان عدد زلنی

درجهٔ هیدرولیز

از مهمترین ویژگی‌های یک پروتئین هیدرولیزشده، درجهٔ هیدرولیز آن است. روش‌های متعددی برای اندازه‌گیری درجهٔ هیدرولیز بیان شده است اما استفاده از واکنش‌گر OPA در مقایسه با سایر روش‌ها، دقیق‌تر است و زمان کوتاه‌تری مورد نیاز است. نتایج نشان می‌دهد که تجزیهٔ واریانس درجهٔ هیدرولیز در همهٔ نمونه‌ها در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. باتوجه‌به نتایج (جدول ۱)، سن‌زدگی اثر معنی‌داری بر درجهٔ هیدرولیز پروتئین‌های گندم داشته است به‌طوری‌که میزان درجهٔ هیدرولیز در گندم کاملاً سن‌زده در مقایسه با گندم سالم افزایش یافته و از ۰/۳۸ به ۱۴/۶۷ درصد رسیده است که دلیل آن را می‌توان به‌هم‌ریختن ساختار پروتئینی در اثر هیدرولیز توسط پروتئاز موجود در بزاق سن دانست که باعث ایجاد پپتیدهای کوتاه زنجیر می‌گردد. Bonet و همکاران (۲۰۰۵) گزارش کردند که گندم سن‌زده دارای درجهٔ هیدرولیز بیشتری نسبت به نوع سالم آن است. همچنین Olance و همکاران (۲۰۱۰) در تحقیق‌های خود، آنزیم پروتئاز را از گندم آسیب‌دیده توسط سن، استخراج و خالص کردند و از آن برای افزایش درجهٔ هیدرولیز در گلوتن استفاده نمودند.

جدول ۱- تأثیر سطوح مختلف سن‌زدگی گندم بر درجهٔ هیدرولیز گلوتن

تیمار	درجهٔ هیدرولیز (درصد)
گندم سالم	۰/۳۸±۰/۰۰۸ [e]
گندم با سن‌زدگی ۲۵ درصد	۴/۷۸±۰/۰۴ [d]
گندم با سن‌زدگی ۵۰ درصد	۸/۲۷±۰/۰۳ [c]
گندم با سن‌زدگی ۷۵ درصد	۱۰/۷۷±۰/۱۷ [b]
گندم با سن‌زدگی ۱۰۰ درصد	۱۴/۶۷±۰/۰۶ [a]

اندازه‌گیری خواص عملکردی

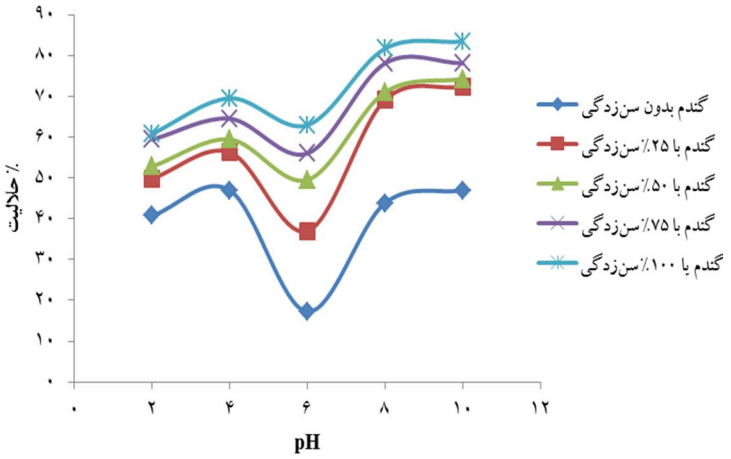
حلالیت

حلالیت از مهمترین ویژگی‌های پروتئین است که با ایجاد پراکندگی همگن مولکول‌ها در سیستم کلوئیدی بر خواص عملکردی دیگر هم اثرگذار است (فاطمی، ۱۳۸۱). چنانچه در شکل (۲) مشاهده می‌شود با افزایش میزان سن‌زدگی، حلالیت پروتئین‌ها نیز افزایش یافت که این تغییر در pH ایزوالکتریک بیشتر مشهود بود. پروتئاز سن یک آنزیم پروتئولیتیکی است که با هیدرولیز پروتئین‌های گندم باعث افزایش حلالیت می‌شود که از دلایل آن می‌توان به باز شدن ساختار پیچیدهٔ پروتئین و کاهش اندازهٔ مولکولی زنجیره‌ها در اثر هیدرولیز اشاره کرد. همچنین انتظار

[1] Proteolytic Enzyme

می‌رود با تأثیر این آنزیم، گروه‌های آب‌دوست از درون مولکول خارج شده و در معرض محیط آبی قرار گیرند که نتیجهٔ آن افزایش حلالیت است. نتایج Olance و همکاران (۲۰۱۰) نیز حاکی بر آن است که حلالیت گلوتن هیدرولیزشده توسط آنزیم پروتئاز آفت سن افزایش می‌یابد و در pH=۶ که نقطهٔ ایزوالکتریک این پروتئین است، حلالیت کمترین و در pH=۱۰ بیشترین مقدار است.

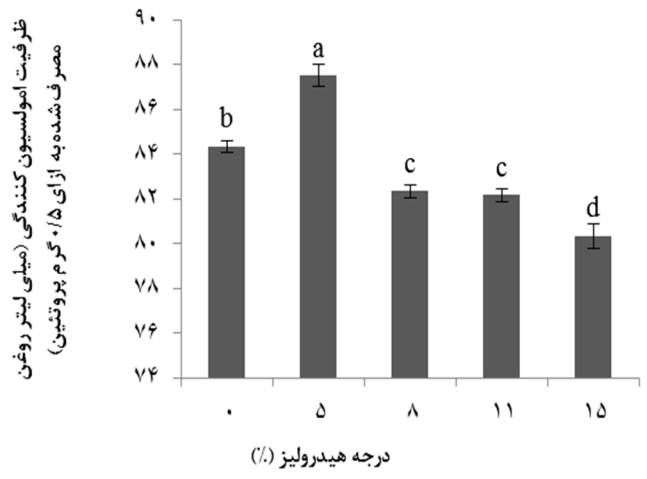
Guan و همکاران (۲۰۰۷) در تحقیق خود بیان کردند که حلالیت hydrolysate پروتئین جو دوسر که توسط آنزیم تریپسین هیدرولیزشده دارای الگوی U شکل است و کمترین میزان حلالیت در pH=۵ که مربوط به pH ایزوالکتریک این پروتئین است، دیده می‌شود و حلالیت در محدودهٔ اسیدی و بازی افزایش می‌یابد.



شکل ۲ - تأثیر سطوح مختلف سن‌زدگی گندم بر حلالیت

ظرفیت امولسیون‌کنندگی

امولسیون به یک سیستم ناهمگن شامل دو مایع غیرقابل اختلاط گفته می‌شود. این قبیل سیستم‌ها دارای حداقل پایداری هستند که علت آن وجود نیروی کشش بین سطحی میان اجزای تشکیل‌دهندهٔ دو مایع است. امولسیون‌کننده‌ها مهمترین عاملی هستند که می‌توانند ثبات و عدم گسیختگی در امولسیون‌ها را تأمین کنند (فاطمی، ۱۳۸۱). شکل (۳) نشان می‌دهد که نمونهٔ گندم با ۲۵ و ۱۰۰ درصد سن‌زدگی، به‌ترتیب بیشترین و کمترین ظرفیت امولسیون‌کنندگی را دارا بودند. پروتئاز سن یک آنزیم پروتئولیتیک می‌باشد که منجر به تجزیهٔ پروتئین‌های گندم می‌گردد. در گندم با میزان سن‌زدگی ۲۵ درصد و درجهٔ هیدرولیز ۴/۷۸ درصد، ظرفیت امولسیون‌کنندگی بیشترین مقدار بود که دلیل آن می‌تواند باز شدن محدود زنجیره‌های پروتئینی باشد که نسبت به حالت اولیهٔ خود، زنجیره‌ها حالت تجمعی و درهم‌پیچیده ندارند و گروه‌های آب‌دوست و آب‌گریز در وضعیت متعادل‌تری قرار گرفته و باعث سهولت در قرار گرفتن این گروه‌ها در سطح میان آب و چربی می‌گردد که افزایش ظرفیت امولسیون‌کنندگی را به دنبال دارد و این خاصیت درنتیجهٔ باز شدن جزئی ساختمان فضایی زنجیرهٔ پروتئینی و از میان رفتن پاره‌ای از اتصالات ایجاد می‌شود. اما چنانچه میزان هیدرولیز از این مقدار بیشتر شود، مقدار پپتیدهای کوتاه‌زنجیر حاصل‌شده از هیدرولیز آنزیمی افزایش می‌یابد که این پپتیدها به‌دلیل کوتاه بودن، کمتر می‌توانند لایه‌های پایدار پروتئینی در اطراف قطره‌های روغن تشکیل دهند و درنتیجه خاصیت امولسیون‌کنندگی آنها کمتر خواهد شد (Kong *et al.*, 2007). Olance و همکاران (۲۰۱۰) در تحقیق‌های خود بیان کردند که ظرفیت امولسیون‌کنندگی در گلوتن هیدرولیزشده توسط پروتئاز سن افزایش می‌یابد.



شکل ۳ - تغییرات ظرفیت امولسیون‌کنندگی نمونه‌های گندم با درصدهای مختلف سن‌زدگی نسبت به درجهٔ هیدرولیز آنها

بررسی ویژگی‌های زیست‌فعالی

در سالهای اخیر، نقش پروتئین‌ها در رژیم غذایی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. بسیاری از پروتئین‌ها خاصیت زیست‌فعالی دارند که این ویژگی به واسطهٔ وجود پپتیدهای زیست‌فعال در ساختار آنها حاصل می‌شود. باتوجه‌به تأثیر این پپتیدها بر سیستم فیزیولوژیک بدن، تحقیق درزمینهٔ شناسایی این پپتیدها امروزه به یک موضوع مهم تبدیل شده است (Guan *et al*., 2007). هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌ها رایج‌ترین راه تولید این پپتیدها می‌باشد که بسته به شرایط فرایند هیدرولیز، پپتیدهای متنوعی با تأثیرهای مختلف ایجاد می‌شود که در این پژوهش دو خاصیت بازدارندگی آنزیم ACE و آنتی‌اکسیدانی این پپتیدها بررسی شد.

بازدارندگی آنزیم ACE

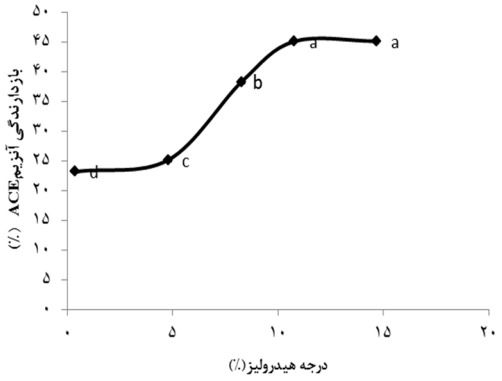
در فرایند تنظیم فشارخون، آنزیم‌ها و مواد شیمیایی خاصی مؤثر هستند که ازآن‌جمله آنزیم مبدل آنژیوتنسین I (ACE[1]) است. این آنزیم با تأثیر روی سیستم آنزیوتنسین-رنین[2] نقش مهمی را در افزایش فشارخون ایفا می‌کند و با تبدیل دکاپپتیدآنژیوتنسین[3] I به اکتاپپتیدآنژیوتنسین[4] II سبب انسداد رگ‌ها می‌شود. همچنین این اکتاپپتید، باعث آزاد شدن استروئید آلدسترون از غدد فوق‌کلیه می‌شود که سنتز این ماده، بازجذب سدیم و درنتیجه افزایش فشارخون را به همراه دارد (Li *et al*., 2004).

نتایج حاصل‌شده مربوط به مقایسهٔ میانگین بازدارندگی آنزیم ACE (شکل ۴) نشان می‌دهد که با افزایش درصد سن‌زدگی، افزایش درجهٔ هیدرولیز و در نتیجهٔ آن کاهش طول زنجیرهٔ پپتیدی، خاصیت بازدارندگی آنزیم ACE نیز افزایش می‌یابد به‌طوری‌که گندم ۱۰۰ درصد سن‌زده با ۴۵/۱ درصد بازدارندگی دارای بیشترین تأثیر و گندم سالم با ۲۳/۱۶ درصد بازدارندگی دارای کمترین میزان تأثیر بر آنزیم ACE است. از محصولات هیدرولیز توسط آنزیم پروتئاز موجود در بزاق سن می‌تواند پپتیدهایی با طول ۱۳-۵ آمینواسید باشد که اکثر آنها در انتهای کربوکسیلی خود دارای توالی Ala-Pro و Pro-Pro هستند. همچنین تری‌پپتیدهای Val-Pro-Pro، Ile-Pro-Pro و Ile-Phe-Leu، دی‌پپتیدهای Val-Tyr و Trp-Leu و همچنین دودکاپپتید Phe-Phe-Val-Ala-Pro-Phe-Pro-Glu-Val-Phe-Gly-Lys نیز می‌توانند دارای این خاصیت باشند (Wang *et al*., 2005).

Thewissen و همکاران (۲۰۱۰) در مطالعه‌های خود از آنزیم‌های مختلف جهت هیدرولیز گلیادین استفاده کردند. نتایج آنها حاکی بر این است که hydrolysateهای حاصل از هیدرولیز، دارای خاصیت بازدارندگی بر آنزیم ACE می‌باشند که دلیل آن وجود آمینواسیدهای هیدروفوبیک آروماتیک نظیر Tyr،

[1] Angiotensin I- Converting Enzyme
[2] Renin- Angiotensin system
[3] Decapeptide angiotensin I
[4] Octapeptide angiotensin II

Phe، Trp و یا آمینواسیدهای هیدروفوبیک مانند Val، Leu و Ile در پایانهٔ C زنجیرهٔ پپتیدی است. Kuba و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند که توالی‌های Val-Tyr، Val-Phe، Val-Trp و Ile-Tyr دارای خاصیت بازدارندگی بر این آنزیم است. تحقیق‌های Jia و همکاران (۲۰۰۹) نشان می‌دهد که چنانچه پروتئین چربی‌زدایی‌شدهٔ جوانهٔ گندم (DWGP[1]) تحت تحت تأثیر فرایند اولتراسونیک قرار گیرد، افزایش زیادی در خاصیت بازدارندگی آنزیم ACE نشان می‌دهد.



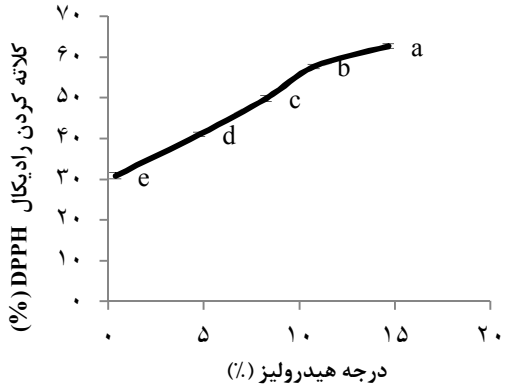
شکل ۴- تغییرات درصد بازدارندگی فعالیت آنزیم ACE نسبت به درجهٔ هیدرولیز

خاصیت آنتی‌اکسیدانی

یکی از مهمترین خواص پپتیدهای زیست‌فعال، خاصیت آنتی‌اکسیدانی است که تأثیر آن بر سلامتی بدن در مطالعه‌های بسیار به اثبات رسیده است.

ویژگی آنتی‌اکسیدانی (توانایی به‌دام‌انداختن رادیکال آزاد DPPH)

نتایج حاصل از مقایسهٔ میانگین تیمارها (شکل ۵) نشان می‌دهد که سن‌زدگی دارای اثر معنی‌داری بر خاصیت آنتی‌اکسیدانی است. گندم ۱۰۰ درصد سن‌زده دارای بیشترین تأثیر بر کلاته کردن رادیکال آزاد DPPH است و گندم سالم، کمترین اثر را داراست. آنزیم پروتئاز موجود در بزاق سن، باعث هیدرولیز پروتئین‌های گندم می‌شود که نتیجهٔ این هیدرولیز می‌تواند پپتیدهایی با زنجیرهٔ کوتاه و خاصیت آنتی‌اکسیدانی باشد. ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی پپتیدها به ساختار، ترکیب و آب‌گریزی آنها بستگی دارد. آمینواسیدهای تیروزین، تریپسین، متیونین، لیزین، سیستئین و هیستیدین دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی هستند (Wang *et al.*, 2005). آمینواسیدهای آروماتیک نیز با اهداکردن پروتون به الکترون‌های رادیکال‌های آزاد، خاصیت کلاته کردن رادیکال‌ها را در آمینواسیدها ارتقاء می‌دهند. همچنین گروه‌های SH در سیستئین نیز خاصیت آنتی‌اکسیدانی به شرط برقراری تماس مستقیم با رادیکال‌ها از خود نشان می‌دهند (Sarmadi *et al.*, 2010). علاوه بر حضور آمینواسیدهای خاص در توالی پپتیدی، موقعیت و وزن مولکولی آنها نیز نقش مهمی در بروز این خاصیت ایفا می‌کند. همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی تحت تأثیر عواملی ازجمله درجهٔ هیدرولیز و نوع پروتئاز استفاده‌شده نیز می‌باشد (Theodore *et al.*, 2007).



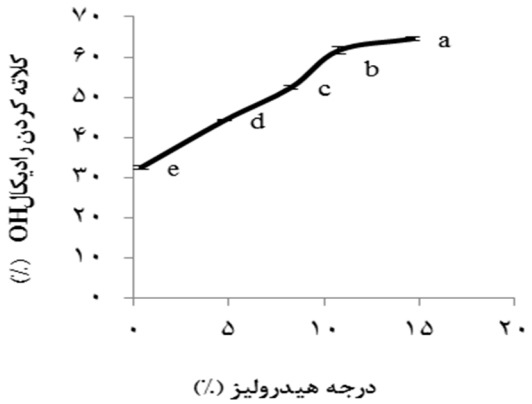
شکل ۵- تغییرات درصد کلاته کردن رادیکال آزاد DPPH نسبت به درجهٔ هیدرولیز

ویژگی آنتی‌اکسیدانی (توانایی به‌دام‌انداختن رادیکال آزاد OH)

توانایی خنثی‌سازی رادیکال آزاد OH، یکی از ویژگی‌های آنتی‌اکسیدان‌ها می‌باشد. به‌طورکلی آنتی‌اکسیدان‌ها با به‌تأخیرانداختن یا ممانعت از انجام اکسیداسیون می‌توانند نقش خود را ایفا کنند. استفاده از این ترکیبات در مواد غذایی رایج‌ترین روش نگهداری بشمار می‌آید. تاکنون فعالیت آنتی‌اکسیدانی در چندین نوع از پروتئین‌های هیدرولیزشده شناسایی شده است (Zhu *et al.*, 2006). از نتایج (شکل ۶) می‌توان دریافت که افزایش درصد سن‌زدگی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارای ارتباط معنی‌دار با یکدیگر

[1] Defatted wheat germ protein

می‌باشند و هرچه شدت هیدرولیز بیشتر باشد خاصیت کلاته‌کنندگی رادیکال OH نیز بیشتر است. Olance و همکاران (۲۰۱۰) بیان کردند که هیدرولیز گلوتن به‌وسیلهٔ پروتئاز آفت سن باعث افزایش در خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌گردد. همچنین نتایج Kong و همکاران (۲۰۰۷) حاکی از آن است که بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به hydrolysateهای حاصل از هیدرولیز توسط پروتئازهای تجاری با وزن مولکولی ۵-۳ کیلودالتون و درجهٔ هیدرولیز حداکثر ۱۵/۸ درصد می‌باشد. Li و همکاران (۲۰۰۷) بیان کردند که درجهٔ هیدرولیز اثر زیادی بر خصوصیات آنتی‌اکسیدانی پپتیدها می‌گذارد، بدین‌صورت‌که پپتیدهای کوچک‌تر نسبت به پپتیدهای بزرگ‌تر، فعالیت خنثی‌سازی و کلاته کردن فلزی بیشتری را نشان می‌دهند.



شکل ۶- تغییرات درصد کلاته کردن رادیکال آزاد OH نسبت به درجهٔ هیدرولیز

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق این‌چنین خلاصه می‌شود که باوجود اینکه گندم سن‌زده ضایعات محسوب می‌شود اما به‌دلیل هیدرولیز محدود گلوتن آن، دارای ویژگی‌های متفاوت با گندم سالم است و خواص عملکردی و تغذیه‌ای آن طی هیدرولیز بهبود می‌یابد. باتوجه‌به اینکه گندم سن‌زده در کشور ما سالانه خسارت زیادی به کشاورزی وارد می‌سازد می‌توان در استفادهٔ اقتصادی از آن در محصولاتی مانند شیرینی، بیسکویت و کراکر باتوجه‌به ویژگی‌های عملکردی و تغذیه‌ای آن اقدام کرد که این امر اهمیت ضرورت بررسی استفاده از گندم سن‌زده در شرایط کنترل‌شدهٔ هیدرولیز به‌عنوان جزء مؤثر در تولید غذاهای فراسودمند باتوجه‌به نقش پپتیدهای زیست‌فعال در بهبود سلامتی را آشکار می‌سازد.

منابع

۱- افسریان، م. ۱۳۸۵. تأثیر تنش رطوبتی و رقم بر جمعیت برخی آفات مهم گندم پائیزه در اصفهان. پایان‌نامه کارشناسی ارشد حشره شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، فصل اول.

۲- بهداد، ا. ۱۳۶۱. آفات گیاهان زراعی ایران. انتشارات نشاط، اصفهان، صفحه۵۸۹.

۳- پایان، ر. ۱۳۸۰. مقدمه‌ای به تکنولوژی فراورده‌های غلات. انتشارات نو پردازان، تهران، فصل سوم.

۴- خانجانی، م. ۱۳۸۳. آفات گیاهان زراعی ایران. انتشارات گیتی، همدان، صفحه ۷۱۹.

۵- فاطمی، ح. ۱۳۸۱. شیمی مواد غذایی. شرکت سهامی انتشار، تهران، فصل سوم.

6- Aja, S., Perez, G., & Rosell, C.M. 2004. Wheat damage by Aelia spp. and Eurygaster spp.: Effects on gluten and water-soluble compounds released by gluten hydrolysis. Journal of Cereal Science, 39(2):187-193.

7- American Association of Cereal Chemists. 2003. Approved Methods of the AACC. St. Paul, Minnesota, USA.

8- Barber, K.J., & Wartesen, J.J. 1982. Some functional properties of acylated wheat gluten. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 30(5):930-934.

9- Bonet, A., Caballero, P.A., Gomez, M., & Rosell, C.M. 2005. Microbial transglutaminase as a tool to restore the functionality of gluten from insect-damaged wheat. Cereal Chemistry, 82(4):425-430.

10- Every, D. 1993. Purification and characterization of a glutenin hydrolyzing proteins from wheat damage by the New Zealand wheat bug, Nysius huttoni. Journal of Cereal Science, 18(3):239-250.

11- Guan, X., Yao, H., Chen, Z., Shan, L., & Zhang, M. 2007. Some functional properties of oat bran protein concentrate modified by trypsin. Food Chemistry, 101(1):163-170.

12- Jia, J., Ma, H., Zhao, W., Wang, Z., Tian, W., Luo, L., & He, R. 2010. The use of ultrasound for enzymatic preparation of ACE-inhibitory peptides from wheat germ protein. Food Chemistry, 119(1):336-342.

13- Kong, X., Zhou, H., & Qian, H. 2007. Enzymatic preparation and functional properties of wheat gluten hydrolysates. Food Chemistry, 101(2):615-620.

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

15- Kuba, M., Tanaka, K., Sesoko, M., Inoue, F., & Yasuda, M. 2009. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in red-mold rice made by Monascus purpureus. Process Biochemistry, 44(10):1139-1143.

16- Li, B., Chen, F., Wang, X., Ji, B. & Wu, Y. 2007. Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometery. Food Chemistry, 102(4):1135-1143.

17- Li, G.H., Le, G.W., Shi, Y.H., & Shrestha, S. 2004. Angiotensin I- converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects. Nutrition Researrch, 24(7):469-486.

18- Mahady, G.B., Huang, Y., Doyle, B.J., & Locklear, T. 2008. Natural products as antibacterial agents. Studies in Natural Products Chemistry, 35:124-148.

19- Matsoukas, N. P. and W. R. Morrision. 1990. Breadmaking quality of ten Greek breadwheats baking and storage tests on bread made by long fermentation and activated dough development processes, and the effects of bug-damage wheat. J. Sci. Food Agric. 53: 363-377.

20- Nejati, F., Rizzello, C.G., Di Cagno, R., Sheikh-Zeinoddin, M., Diviccaro, A., Minervini, F., & Gobbetti, M. 2013. Manufacture of a functional fermented milk enriched of Angiotensin-I Converting Enzyme (ACE)-inhibitory peptides and γ-amino butyric acid (GABA). LWT-Food Science and Technology, 51(1):183-189.

21- Nielsen, P.M., Petersen, D., & Dambmann, C. 2001. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. Journal of Food Science, 66(5):642-646.

22- Olance, B., & Ozay, D. 2010. Preparation and functional properties of gluten hydrolysates with wheat-bug (Eurygaster spp.) protease. Cereal Chemystry, 87(6):518-523.

23- Sarmadi, B.H., & Ismail, A. 2010. Antioxidative peptides from food proteins: A review. Journal of Peptide Science, 31(10):1949-1956.

24- Theodore, A.E., & Kristinsson, H.G. 2007. Angiotensin converting enzyme inhibition of fish protein hydrolysates prepared from alkaline-aided channel catfish protein isolate. The Journal of the Science of Food and Agriculture, 87(1):2353-2357.

25- Thewissen, B.G., Pauly, A., Celus, I., Brijs, K., & Delcour. J.A. 2011. Inhibition of angiotensin I-converting enzyme by wheat gliadin hydrolysates. Food Chemistr, 127(4):1653-1658.

26- Torbica, A., Antov, M., Mastilovic, J., & Knezevic, D. 2007. The influence of changes in gluten complex structure on technological quality of wheat (*Triticumaestivum* L.). Food Research International, 40(8):1038-1045.

27- Wang, W.Y., & De Mejia, E.G. 2005. A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 4(4):63-78.

28- Zhu, K., Zhou, H., & Qian, H. 2006. Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. Process Biochemistry, 41(6):1296-1302.

Evaluation of Qualitative, Functional and Bioactive Properties of Bugged Wheat

Maryam Kiumarsi[1*], Mahdi Kadivar[2], Reza Zareie[3], Majid Talebi[4]

1- Graduated of master of science, food science department, Agriculture college, Isfahan university of Technology, Isfahan, Iran
* Corresponding author (maryam_kiumarsi@yahoo.com)
2- Professor, Food science department, Agriculture college, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran
3- Assistant Professor, Chemistry and Biochemistry department, University of Western Australia, Perth, Australia
4- Associated Professor, Biotechnology department, Agriculture college, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

Abstract

Despite all the progresses made in the field of pest control, bug is yet the hazardous pest in Iran. This insect injects a salivary proteinase into immature wheat kernels resulting in poor rheological properties, which leads to having bread with low volume and unacceptable texture. On the other hand, protein hydrolysis of gluten can improve the functional properties and also body physiological mechanisms according to producing bioactive peptides. In this study wheat samples with variable proportion of bug-infested grains (25, 50, 75 and 100%) were initially prepared and then qualitative, functional and bioactive tests were performed to evaluate the effect of suni-bug damage. Results showed that Zeleny sedimentation value decreased by increasing bug damage in samples indicating low quality in gluten for bread making. On the other hand, by increasing proportion of bug damage, degree of hydrolysis increased and functional properties of wheat samples such as solubility and emulsifying capacity were improved. By increasing the degree of hydrolysis, protein solubility also increased and the highest emulsifying capacity was observed in 25% suni-bug wheat sample. The results of evaluating bioactive properties in wheat samples indicated that by increasing the degree of bug attack, producing short peptides with ACE inhibitory and antioxidant activity increased, therefore the highest percentage of ACE inhibition and antioxidant ability is observed in 100% suni-bug damaged sample whereas the lowest was evidenced in the sound wheat sample.

Keywords: Bioactive Peptides, Bugged Wheat, Degree of Hydrolysis, Functional Properties