

امکان سنجی و بهینه سازی تولید ماست کم چرب فراسودمند با استفاده از پروتئین های هیدرولیز شده شاه بلوط

محمد رضا آقا جانی فشارکی^۱، سیمین اسداللهی^۲، غلامحسین اسدی^۳

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی تهران، ایران.

^۲ دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا

^۳ دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی؛ واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی تهران، ایران

ایمیل نویسنده مسئول: siminasadollahi5@gmail.com

چکیده

در این تحقیق پروتئین شاه بلوط در مقادیر ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ درصد در فرمولاسیون ماست فراسودمند کم چرب استفاده شد. به منظور بهینه سازی فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده از روش سطح پاسخ استفاده گردید. سطوح فاکتورها براساس مطالعات انجام شده شامل زمان هیدرولیز آنزیمی (۱۸۰ - ۶۰ دقیقه)، نسبت آنزیم به سوبسترا (۱۴۰ - ۵۰ آنسون/کیلوگرم پروتئین)، دما (۹۰ - ۳۰ درجه سانتی گراد)، pH در محدوده ۷ تا ۹ و آنزیم آلکالاز بود. از روش سطح پاسخ (طرح مرکب مرکزی) برای بهینه سازی شرایط هیدرولیز آنزیمی استفاده شد. نتایج نشان داد که نقطه بهینه با در نظر گرفتن هدف با حداکثر میزان فعالیت آنتی اکسیدانی (DPPH) و همچنین در آمینو اسیدهای آزاد در شرایط درجه حرارت ۵۷/۵۰، زمان هیدرولیز ۶۰ دقیقه، pH معادل ۸، نسبت آنزیم به سوبسترا معادل ۹۷/۵۰ واحد آنسون/کیلوگرم سوبسترا پیشنهاد شد. با افزایش میزان استفاده از پروتئین هیدرولیز شده شاه بلوط تا میزان ۳ درصد میزان شاخص درصد آب اندازی، روشنایی و زردی مربوط به رنگ نمونه ها کاهش و میزان ویسکوزیته، قابلیت نگهداری آب، شاخص ماده خشک و شاخص قرمزی رنگ افزایش یافت. نتیجه گیری نهایی نشان می دهد که مجموع امتیازات ارزیاب ها در کلیه خصوصیات حسی نشان می دهد که تیمار ماست دارای ۳ درصد پروتئین هیدرولیز شده دارای بالاترین میزان مطلوبیت حسی در بین تیمارهای ماست بوده و تیمارهای ۴ و ۵ درصد دارای مطلوبیت کمتری در مقایسه با سایر تیمارها و تیمار شاهد می باشند. تیمارهای دارای مقادیر ۱ و ۲ درصد دارای مطلوبیت بالاتر از تیمار شاهد و کمتر از تیمار ۳ درصد می باشد.

کلمات کلیدی: پروتئین هیدرولیز شده شاه بلوط، ماست فراسودمند کم چرب، بهینه سازی

۱- مقدمه

پروتئین ها به طور گسترده در صنعت غذا قابل استخراج و استفاده هستند. هیدرولیز آنزیمی یکی از روش های مورد استفاده جهت بهبود ویژگی های کاربردی و تغذیه ای پروتئین های غذایی است. اکسیداسیون چربی ها یکی از موارد نگران کننده در صنایع غذایی است زیرا از جمله عوامل ایجاد کننده طعم و بوی نامطلوب و برخی بیماری ها در بدن انسان هستند که عامل آنها پراکسیداسیون لیپیدها و ترکیبات مولکولی با وزن کم تولید شده در مراحل نهایی اکسیداسیون می باشد (۱). از این رو استفاده از آنتی اکسیدان های مصنوعی در سال های گذشته در صنایع غذایی رایج بوده اما با توجه به نگرانی های شایع مصرف کنندگان در رابطه با آنتی اکسیدان های مصنوعی و به خطر افتادن سلامتی بدن، تحقیقاتی در رابطه با آنتی اکسیدان های طبیعی در دهه ی اخیر انجام شده است. آنتی اکسیدان های

مصنوعی نسبت به آنتی اکسیدان های طبیعی فعالیت قوی تری دارند اما به دلیل سمیت این ترکیبات شیمیایی استفاده از آنها محدود شده است (۲). با توجه به علاقه بیشتری که محققان برای بررسی آنتی اکسیدان های طبیعی در سالهای اخیر از خود نشان داده اند، تحقیقات زیادی روی فعالیت آنتی اکسیدانی پپتیدهای زیست فعال انجام شده است که مشخص شده است جهت به تأخیر انداختن فساد مواد غذایی و دارویی، استفاده از آنتی اکسیدان های طبیعی جایگزین مناسبی برای آنتی اکسیدان های مصنوعی می باشد. پپتیدهای زیست فعال با جرم مولکولی کمتر از ۶۰۰۰ کیلو دالتون، در اندازه های ۲ تا ۲۰ اسید آمینه می باشند. پپتیدهای زیست فعال اغلب به عنوان اجزاء پروتئینی مورد مطالعه قرار می گیرند. این پپتیدها در ساختار اصلی غیرفعال بوده و پس از آزاد شدن به وسیله ی هیدرولیز آنزیمی، عملکرد فیزیولوژیکی مختلفی از خود نشان می دهند (۳). توانایی آنتی اکسیدانی پپتیدهای زیست فعال به تأثیرات چندگانه نسبت داده می شوند که برخی از این ویژگی ها از قبیل قابلیت آنها به عنوان شلاته کننده ی فلزات واسطه، مهار رادیکال آزاد ¹DPPH، قدرت احیاء کنندگی یون آهن، فعالیت ضدسرطانی، کاهش فشار خون می باشد (۴). تاکنون بیشترین مطالعات پیرامون تأثیر فرآیند هیدرولیز آنزیمی بر ویژگی های هیدرولیز شده ی تولید شده از پروتئین نهایی کازئین، آب پنیر و سویا انجام گرفته است (۵). هیدرولیز پروتئین ها یکی از جدیدترین فن آوری ها برای تولید فرآورده های با ارزش افزوده بالا می باشد و روش های شیمیایی و بیولوژیکی جهت این منظور به کار گرفته می شوند. فرآیند کاربرد آنزیم های تجاری به جای فرآیندهای شیمیایی و یا آنزیم های داخلی دارای مزایای بسیار زیادی است زیرا کل فرآیند هیدرولیز کامل تحت کنترل است و در نتیجه فرآورده های با خواص مشخص تولید می شود. هیدرولیز آنزیمی پروتئین های غذایی روشی موثر در بازیابی پپتیدهای زیست فعال قوی می باشد. در مقایسه با آنزیم های با منشأ گیاهی و جانوری، آنزیم های میکروبی دارای مزایای بیشتری هستند که از آن جمله می توان به تنوع خواص پروتئولیتیکی و پایداری بیشتر در pH و دماهای مختلف اشاره نمود. به طور کلی آنزیم Alcalase 2.4L به دلیل عملکرد در pH قلیایی، تولید پروتئین هیدرولیز شده با درجه هیدرولیز بالاتر و طول زنجیره پپتیدی کوتاه تر، بیشترین توجه را به خود اختصاص داده است (۶). آنتی اکسیدان ها سبب کاهش اکسیداسیون پروتئین همچنین واکنش میان کربونیل های مشتق شده از لیپیدها یا پروتئین ها شده که نتیجه آن تغییر در ویژگی های عملکردی پروتئین هاست. در سال های اخیر توجه به استفاده از آنتی اکسیدان های طبیعی منجر به انجام تحقیقاتی در زمینه بررسی قابلیت آنتی اکسیدانی پپتیدهای فعال بیولوژیک از پروتئین های هیدرولیز شده ای نظیر پروتئین سویا، گندم، کازئین شیر، پروتئین ماهی و سایر موارد شده است. پپتیدهای مختلفی از مواد غذایی پروتئینی به دست آمده است که دارای ظرفیت آنتی اکسیدانی بوده و فعالیت بیولوژیکی آن ها به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است (۷) میوه "شاه بلوط" که ظاهری مشابه با فندق دارد یکی از میوه های کمیاب اما پرخاصیتی است که ارزش غذایی بالایی دارد و برای درمان بیماری های قلبی و برخی سرطان ها و ... استفاده می شود. بر خلاف سایر آجیل ها، شاه بلوط غنی از ویتامین ث، کربو هیدرات های پیچیده، اسید فولیک، اسیدهای چرب هستند و چربی و کالری پایینی دارند (۹). ماست یکی از محبوب ترین محصولات لبنی است که به خاطر کیفیت تغذیه ای و سلامتی بخشی که دارد به همان اندازه که خواص حسی و چشایی مناسبی دارد بطور گسترده مورد علاقه می باشد. در یک تحقیق مظلومی و همکاران (۱۴۰۲) اثرات مظلومی و همکاران (۱۴۰۲) تأثیر پروتئین هیدرولیز شده جوانه ماش بر ویژگی های ماست همزده را بررسی نمودند و نتایج این بررسی نشان داد که استفاده از پروتئین هیدرولیز شده جوانه ماش می تواند جایگزین قابل قبولی برای کنسانتره پروتئین شیر در ماست همزده باشد. با توجه به اهمیت تولید محصولات سلامتی بخش و یافتن منابع پروتئینی جدید و افزایش رقابت بین تولیدکنندگان مواد غذایی و بخصوص صنایع لبنی در تولید محصولات سلامتی بخش و همچنین افزایش علاقه مصرف کنندگان جهت مصرف محصولات سلامتی بخش، در این تحقیق نیز ماست با استفاده از خواص کاربردی پروتئین های شاه بلوط هیدرولیز شده تهیه و فرموله شد.

¹2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

۲- روش انجام تحقیق

۲-۱- تهیه و آماده سازی میوه شاه بلوط

در این تحقیق میوه شاه بلوط هندی از موسسه تحقیقات نهال و بذر کرج تهیه و پوست گیری شد.

۲-۲- آماده سازی کنجاله میوه شاه بلوط

پس از حذف مواد خارجی، مغز شاه بلوط توسط دستگاه آسیاب (۳۱۰۰، پرتن ساخت آلمان) به آرد تبدیل شد. آرد حاصل به مدت ۱۶ ساعت با حلال هگزان به نسبت ۳:۱ چربی گیری و در دمای اتاق خشک، و تا مرحله استخراج پروتئین در یخچال نگهداری شد (۵).

۲-۳- محتوی تانن تجمع یافته ۲

برای محاسبه تانن تجمع یافته نیز یک میلی لیتر محلول استخراجی فیبر شاه بلوط با ۲ میلی لیتر واکشگر وانیلین^۱ (۰/۵ درصد وزنی/حجمی) تهیه شد. محلول هیدروکسید کالر (۲ میلی لیتر، ۴ درصد وزنی/وزنی) به مخلوط اضافه شد و سپس محلول در تاریکی انکوبه شد. پس از قرار گرفتن در تاریکی جذب در ۵۰۰ نانومتر بعد از ۲۰ دقیقه انکوباسیون اندازه گیری شد. برای اندازه گیری محتوی تانن تجمع یافته، استاندارد کاتچین در غلظت های (۳۰۰۰-۵۰۰ گرم / میلی لیتر) استفاده شد (۶).

۲-۴- تهیه کنسانتره پروتئین میوه شاه بلوط

کنجاله میوه شاه بلوط چربی گیری شده به نسبت ۱:۱۰ در آب پراکنده شد. سپس pH محلول توسط محلول سود ۱ نرمال به ۱۰ رسانده شده و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق مخلوط شد. محلول حاصل به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۵۰۰g و دمای ۴ درجه سانتی گراد در سانتریفوژ یخچال دار (مدل^۲ کامبی ۵۱۴ آر کره جنوبی) قرار گرفت. به منظور رسوب پروتئین های میوه شاه بلوط سوپرناتانت حاصل توسط اسید کلریدریک ۱ نرمال به pH=5 رسانده شد و تحت شرایط مشابه سانتریفوژ شد. رسوب بدست آمده (کنسانتره پروتئین) برای هیدرولیز مورد استفاده قرار گرفت (۷).

۲-۵- هیدرولیز کنسانتره پروتئین میوه شاه بلوط

به منظور هیدرولیز کنسانتره پروتئین میوه شاه بلوط، کنسانتره به نسبت (۵درصد وزنی/حجمی) در بافر فسفات pH=9 پراکنده شد. سپس آنزیم در شرایط مطابق با جدول مطابق کدبندی ۱ استفاده شد. در انکوباتور شیکردار (مدل VS-8480، کره جنوبی) با دور ۲۰۰ دور بر دقیقه انجام شد. در انتها واکنش آنزیمی در ۸۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه متوقف شد و برای حذف ترکیبات اضافه سانتریفوژ کردن در ۵۰۰g به مدت ۳ دقیقه انجام گرفت (۸).

۲-۵-۱- محاسبه میزان ترکیبات فنولی کل^۵

میزان ترکیبات فنولی بر اساس روش کالریمتری بر اساس روش Singleton and Rossi (1965) با کمی تغییرات محاسبه شد. عصاره استخراج شده (به میزان ۲۰۰ میکرولیتر) پس از تقسیم شدن به دو قسمت مساوی با واکشگر فنولی فولین سیوکالتیو^۶ (به میزان ۸۰۰ میکرولیتر) مخلوط شد. بعد از ده دقیقه محلول کربنات سدیم (۲ میلی لیتر) به مخلوط اضافه شده و سپس در مکان تاریک به مدت ۹۰ دقیقه انکوبه شد. سپس جذب محلول در ۷۲۵ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتری اشعه فرابنفش - نور مرئی مدل (BIOMATE 3S)

¹Perten

²Condensed tannin content (CTC)

³Vanillinreagen

⁴Combi514R

⁵Total phenolic content (TPC)

⁶Folin-Ciocalteu's phenol reagent

Thermo Scientific, MA) ساخت کشور آمریکا قرائت شد. غلظت های (۵۰۰-۱۰۰ میکروگرم برلیتر) به عنوان منحنی استاندارد استفاده شد (۹).

۲-۵-۲- محتوی تانن تجمع یافته^۱

برای محاسبه تانن تجمع یافته نیزیك میلی لیتر محلول استخراجی فیبر شاه بلوط با ۲ میلی لیتر واکشگر وانیلین^۲ (۰/۵ درصدوزنی/حجمی) تهیه شد. محلول هیدروکسید کلر (۲ میلی لیتر، ۴ درصد وزنی/وزنی) به مخلوط اضافه شد و سپس محلول درتاریکی انکوبه شد. پس از قرار گرفتن درتاریک جذب در ۵۰۰ نانومتر بعد از ۲۰ دقیقه انکوباسیون اندازه گیری شد. برای اندازه گیری محتوی تانن تجمع یافته، استاندارد کاتچین در غلظت های (۳۰۰-۵۰۰ گرم/میلی لیتر) استفاده شد (۱۱).

۲-۵-۳- ارزیابی درصد فیبر خام

میزان فیبر خام طبق روش استاندارد 991/43-AOAC محاسبه شد (۱۲).

۲-۶- آزمایشات بهینه سازی

به منظور بهینه سازی فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده از روش سطح پاسخ استفاده گردید. سطوح فاکتورها براساس مطالعات انجام شده شامل زمان هیدرولیز آنزیمی (۱۸۰-۶۰ دقیقه)، نسبت آنزیم به سوبسترا (۱۴۰-۵۰ آنسون/کیلوگرم پروتئین)، دما ۵۵ درجه سانتی گراد، pH معادل ۸ و نوع آنزیم (آلکالاز) می باشند. برای تعیین فاکتورهای موثر محدوده ها از مقالات مشابه انتخاب شد و سپس با روش سطح پاسخ (طرح مرکب مرکزی) و نرم افزار Design Expert 12 برای بهینه سازی شرایط هیدرولیز آنزیمی استفاده شد (۱۳).

۲-۷- اندازه گیری فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH

برای این منظور ۱۰۰۰ میکرولیتر از نمونه ی پروتئین هیدرولیز شده با ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول (DPPH/۰ میلی مولار) تهیه شده در اتانول ۹۶٪ مخلوط شد، مخلوط به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی نگهداشته شد. در نهایت جذب محلول در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه گیری شد. در نمونه شاهد به جای محلول پروتئین هیدرولیز شده از ۱۰۰۰ میکرولیتر اتانول استفاده شد. فعالیت مهارکنندگی فعالیت رادیکال از رابطه زیر محاسبه گردید: (۹).

$$100 \times (\text{جذب نمونه کنترل} / \text{جذب شاهد} - \text{جذب نمونه کنترل}) = \text{درصد فعالیت مهارکنندگی رادیکال های آزاد رابطه ۱}$$

۲-۸- اندازه گیری درجه هیدرولیز

اندازه گیری درجه هیدرولیز مطابق با روش Merritt و Hoyle انجام شد. برای این منظور س از هیدرولیز نمونه توسط محلول تری کلرواستیک ۲۰ درصد، حجم برابر از محلول فوقانی و تری کلرواستیک اسید ۲۰ درصد برداشته شد. محلول حاصل در دمای ۱۰ درجه سانتی گراد، با دور ۶۷۰۰ و به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفته و جهت جمع آوری ترکیبات محلول در تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد سانتریفیوژ انجام شد. مبنای این روش اندازه گیری درصد نسبت پروتئین های محلول در تری کلرو استیک اسید به کل پروتئین های موجود در نمونه می باشد. نهایتاً درجه هیدرولیز با استفاده از رابطه ذیل به دست آمد:

$$\text{کل پروتئین های نمونه} / \text{پروتئین حل شده در محلول ۱۰ درصد از تری کلرو استیک اسید} = \text{DH} \quad \text{رابطه ۲}$$

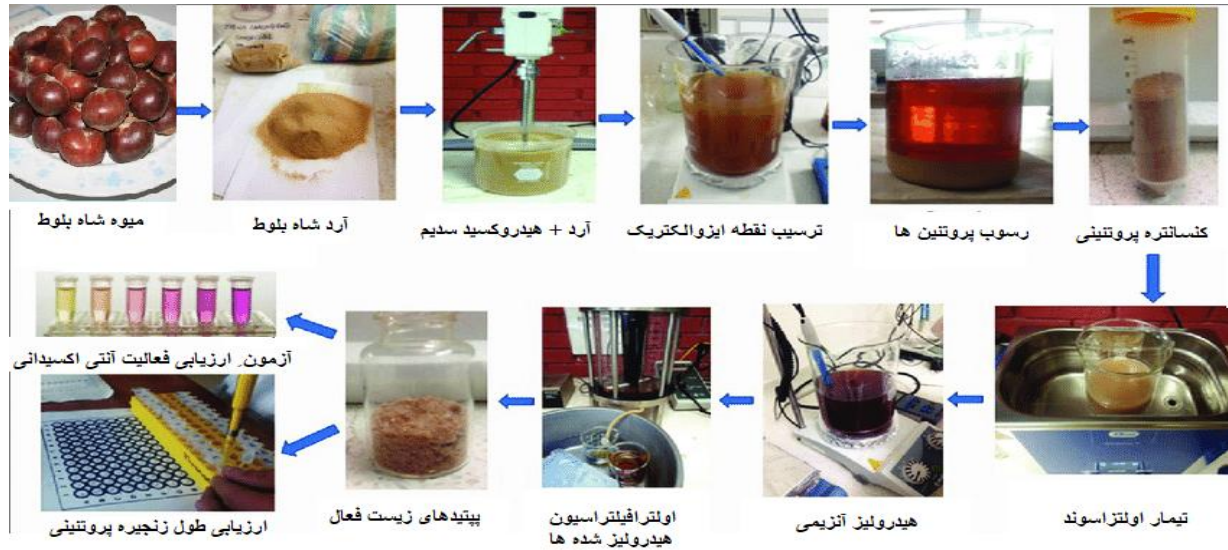
^۱Condensed tannin content (CTC)

^۲Vanillinreagen

۹-۲- اندازه‌گیری طول زنجیره پپتید PCL^۱

طول تقریبی پپتید به روش Rasco و Kristinsson اندازه‌گیری شد. در این روش مطابق رابطه زیر از درجه هیدرولیز جهت محاسبه طول تقریبی زنجیره پپتید استفاده گردید. در این رابطه درجه هیدرولیز (DH) برحسب درصد به کار برده شده است.

$$\text{PCL} = 100 / \text{DH} \quad \text{رابطه ۳}$$



شکل ۱- مراحل هیدرولیز پروتئین های شاه بلوط و به دست آوردن پپتیدهای زیست فعال

^۱ Peptide chain length

جدول ۱- سطوح کدبندی و واقعی آزمایش ها در آزمایش بر اساس مطالعهروش رویه سطح پاسخ و طرح Central Composite

Std	تیمار	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4
		A: درجه حرارت	B: زمان	C:pH	D:E/S
۹	۳	۴۲/۵	۳۰	۷	۱۴۲/۵
۱۲	۴	۴۲/۵	۹۰	۷	۱۴۲/۵
۲	۹	۷۲/۵	۳۰	۷	۵۲/۵
۱۰	۱۱	۷۲/۵	۳۰	۷	۱۴۲/۵
۴	۱۹	۷۲/۵	۹۰	۷	۵۲/۵
۳	۲۴	۴۲/۵	۹۰	۷	۵۲/۵
۱	۲۷	۴۲/۵	۳۰	۷	۵۲/۵
۱۱	۲۹	۴۲/۵	۹۰	۷	۱۴۲/۵
۲۱	۱۴	۵۷/۵	۶۰	۷/۵	۹۷/۵
۲۳	۱	۵۷/۵	۶۰	۸	۷۵
۲۴	۶	۵۷/۵	۶۰	۸	۱۲۰
۲۰	۷	۵۷/۵	۷۵	۸	۹۷/۵
۱۸	۸	۶۵	۶۰	۸	۹۷/۵
۲۷	۱۲	۶۵	۶۰	۸	۹۷/۵
۲۸	۱۶	۵۷/۵	۶۰	۸	۹۷/۵
۱۷	۱۷	۵۰	۴۵	۸	۹۷/۵
۱۹	۲۰	۵۷/۵	۶۰	۸	۹۷/۵
۲۵	۲۱	۵۷/۵	۶۰	۸	۹۷/۵
۲۶	۲۲	۵۷/۵	۶۰	۸	۹۷/۵
۲۸	۲۶	۵۷/۵	۶۰	۸	۹۷/۵
۳۰	۲۸	۵۷/۵	۶۰	۸	۹۷/۵
۲۲	۱۰	۵۷/۵	۳۰	۸/۵	۹۷/۵
۱۴	۲	۷۲/۵	۹۰	۹	۱۴۲/۵
۱۵	۵	۴۲/۵	۹۰	۹	۱۴۲/۵
۸	۱۳	۷۲/۵	۳۰	۹	۵۲/۵
۵	۱۵	۴۲/۵	۹۰	۹	۵۲/۵
۱۶	۱۸	۷۲/۵	۳۰	۹	۱۴۲/۵
۶	۲۳	۷۲/۵	۳۰	۹	۵۲/۵
۱۳	۲۵	۴۲/۵	۹۰	۹	۱۴۲/۵
۷	۳۰	۴۲/۵	۶۰	۹	۵۲/۵

۲-۱۰-۱- تهیه و فرمولاسیون تیمارهای ماست

۲-۱۰-۱-۱- فعالسازی استارتر

یک بسته استارتر ترموفیل (CHI) ساخت شرکت کریستین هانسن دانمارک (از نوع DV5) حاوی استرپتوکوکوس ترموفیلوس و لاکتوباسیلوس بولگاریکوس) طبق دستور شرکت سازنده در یک لیتر شیر پاستوریزه که دمای آن به ۴۲ درجه سلسیوس رسیده بود تلقیح گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور ۴۲ درجه سلسیوس قرار داده شد تا فعال گردد (۱۱).

۲-۱۰-۱-۲- قابلیت زنده مانگی باکتری های آغازگر ماست

برای ارزیابی بقای باکتری های آغازگر از کلنی های تهیه شده سوسپانسیون نیم مک فارلند تهیه شده و سپس در شرایط محیط کشت MRS آگار در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۷۲ ساعت کشت شده و در روزهای صفر، ۷، ۱۴، و ۲۱ پس از تولید طی نگهداری در دمای ۴ درجه سلسیوس انجام پذیرفت (۶).

۲-۱۰-۱-۳- تهیه و فرمولاسیون ماست

بعد از دریافت و استاندارد کردن شیر از نظر چربی، درصد ماده خشک و پایدار کننده، همگن سازی در دمای ۶۰ درجه سلسیوس انجام گرفت. سپس شیر در بن ماری (ساخت شرکت فراگستر، ایران) در دمای ۹۵-۹۰ درجه سلسیوس به مدت ۳-۵ دقیقه حرارت دیده و تا دمای ۴۵-۴۰ درجه سلسیوس خنک شد. در این مرحله میکروارگانسیم آغازگر با نسبت ۱ درصد وزنی/حجمی اضافه و بسته بندی شده و در انکوباتور (مدل RT3 شرکت ریجان طب، ایران) در دمای ۴۳ درجه سلسیوس به مدت حدود ۳ ساعت تا رسیدن به اسیدیته و pH مورد نظر نگهداری شد. قبل از بسته بندی لخته ایجاد شده شکسته و نمونه ماست جهت یکنواخت شدن همزده می شود (۱۱). نمونه های پروتئین هیدرولیز شده با مقادیر ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ درصد وزنی/وزنی به تیمارهای ماست قبل از هم زدن اضافه شد.

۲-۱۰-۱-۴- ارزیابی درصد ماده خشک

اندازه گیری ماده خشک با استفاده از دستگاه ترازوی رطوبت سنج Sartorius (مدل MA35، ساخت آلمان) انجام شد (۱۷).

۲-۱۰-۱-۵- اندازه گیری درصد آب اندازی

مطابق روش Kadamany-AI و همکاران (۲۰۰۳) مقدار ۲۵ گرم نمونه روی کاغذ صافی واتمن گسترده شد و روی قیف بوخنر قرار داده شد. میزان آب اندازی نمونه ها تحت خلأ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق از رابطه زیر محاسبه شد (۱۸).

$$100 \times \text{وزن اولیه نمونه} / \text{وزن نمونه بعد از توزین} - \text{وزن اولیه نمونه} = \text{درصد آب اندازی} \quad \text{رابطه ۳}$$

۲-۱۰-۱-۶- اندازه گیری ویسکوزیته و بافت

ویسکوزیته و بافت نمونه ها با استفاده از ویسکومتر بروکفیلد مدل (DV-II+PRO) نوع RV انجام گرفت. برای این منظور نمونه ها به مدت ۱۸ ساعت در ۴ درجه سلسیوس نگهداری شده و ویسکوزیته نمونه ها با ۳۰rpm اندازه گیری شده و بر حسب سانتی پواز گزارش شد (۱۶).

۲-۱۰-۱-۷- آنالیز بافت نمونه ها

آنالیز بافت آن ها نیز با ارائه مدل TPA^۲ که در عمق ۳۰ میلی متری نمونه با استفاده از پروب به قطر ۳۸/۱ میلی متر و ارتفاع ۳۰ میلی متر انجام شد، گزارش گردید. سرعت پروب یک میلی متر بر ثانیه بوده (۱۶).

¹ Direct Vat Set

² Texture Profile Analysis

۲-۱۰-۸- اندازه گیری ظرفیت نگهداری آب

آزمون ظرفیت نگهداری آب با دور ۱۳۵۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۰ درجه سلسیوس توسط دستگاه سانتریفیوژ (Sigma laborzentrifugen 3k-30) انجام شد سپس آب آزاد شده خارج گشت و بعد از خشک شدن لخته، ظرفیت نگهداری آب نمونه از رابطه زیر بدست آمد و نتایج حاصله به صورت درصد بیان شد (۴).

$$100 \times [\text{وزن اولیه نمونه ماست} / (\text{وزن تیوپ خالی} - \text{وزن تیوپ با لخته})] = \text{ظرفیت نگهداری ماست رابطه ۴}$$

۲-۱۰-۹- ارزیابی حسی

برای ارزیابی حسی از روش هدونیک ۵ نقطه ای (عالی = ۵، بسیار خوب = ۴ متوسط = ۳ بد = ۲ نه خوب نه بد = ۱) توسط ۱۰ ارزیاب تعلیم دیده موسسه تحقیقات فنی و مهندسی کرج استفاده شد و صفات مورد بررسی شامل طعم و مزه، عطر و بو، رنگ ظاهری، قوام و پذیرش کلی بود (۱۱).

۳- نتایج

۳-۱- نتایج اندازه گیری های فیبر شاه بلوط

جدول ۲ نتایج ارزیابی خصوصیات فیبر شاه بلوط را نشان می دهد:

جدول ۲- نتایج ارزیابی فیبر شاه بلوط

ترکیبات فنولی کل	محتوی تانن تجمع یافته	درصد فیبر خام
٪ ۲۵/۶	٪ ۶/۹	٪ ۱۴/۳

• داده ها میانگین سه تکرار هستند.

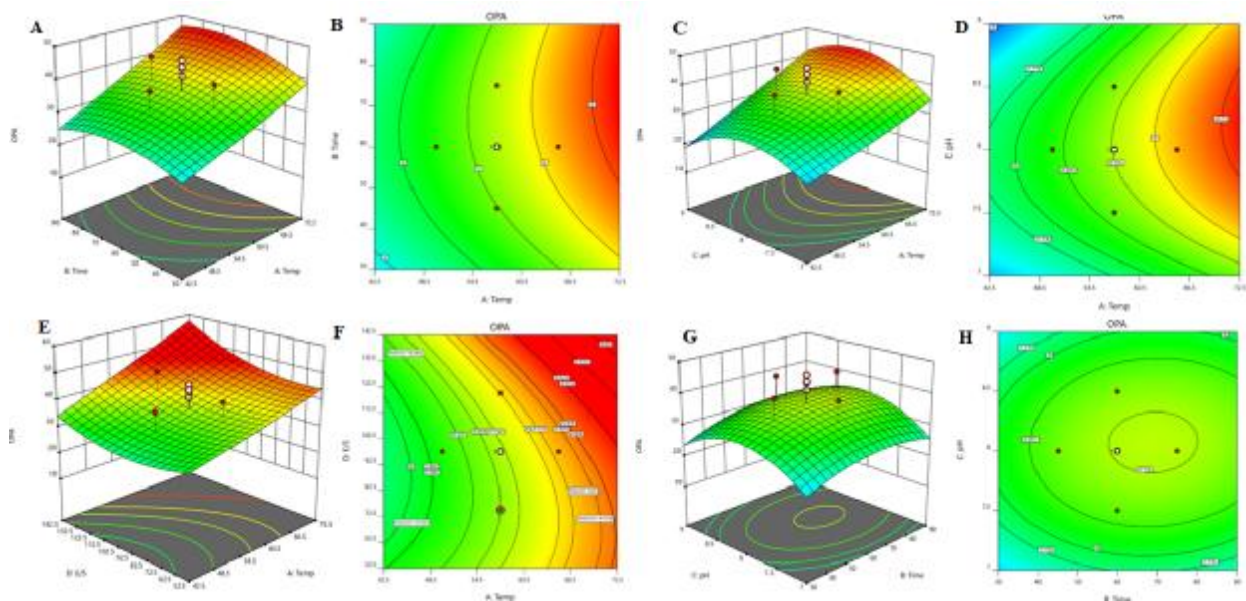
۳-۲- نتایج میزان گروه های آمین آزاد محصول هیدرولیز پروتئینی شاه بلوط

بر اساس جدول ۳ ملاحظه شد که رابطه OPA و متغیرهای تحقیق از نوع درجه دوم و با ضریب همبستگی $R^2 = 0.9588$ می باشد. بنابراین مدل به خوبی توانسته است ۹۵/۸۸ درصد از کل تغییرات را در محدوده متغیرهای مورد بررسی را توضیح دهد. شاخص عدم تطبیق با داده های آزمایش معنی دار نشد ($p > 0.05$) که این امر بیانگر مناسب بودن مدل در جهت پیش بینی دامنه ی متغیرهای مورد آزمایش می باشد. تاثیر متغیر درجه حرارت، pH و نسبت آنزیم به سوبسترا بر میزان شاخص OPA معنی دار می باشد و بنابراین مدل ذیل برای پیش بینی متغیرهای تحقیق پیشنهاد می شود.

$$\begin{aligned} \text{OPA} = & +36/92 + 9/11A + 2/22B + 1/01C + 4/07D + 1/59AB + 2/43AC + 2/63AC + 3/62AD + 0/5057BC - 1/10BD - 2/82CD - \\ & 0/4506BC - 2/82CD + 0/4506A^2 - 3/76B^2 - 8/00C^2 + 4/48D^2 \end{aligned}$$

با توجه به شکل ۲ (A, B) در شرایط ثابت ($\text{pH} = 8$ و $E/S = 97/5$)، افزایش درجه حرارت از ۴۲/۵ درجه سانتی گراد تا ۷۲/۵ درجه سانتی گراد منجر به افزایش شاخص OPA گردید. کمترین میزان OPA به میزان ۳۸ و بالاترین آن به میزان ۱۰ در این محدوده حرارتی مشاهده شد. دما در محدوده ۳۰ تا ۹۰ دقیقه و در شرایط ثابت ($\text{pH} = 8$ و $E/S = 97/5$)، تاثیرات معنی داری بر شاخص OPA داشت و در محدوده ۳۰ و ۹۰ درجه در حداقل مقدار خود به ترتیب OPA زیر محدوده ۱۰ و ۲۰ بوده و در محدوده ۶۰ دقیقه به بالاترین میزان خود در شرایط ثابت ($\text{pH} = 8$ و $E/S = 97/5$) و به میزان ۳۰ مشاهده شد. نقطه بهینه مرکزی در شرایط ثابت ($\text{pH} = 8$ و $E/S = 97/5$)، در درجه حرارت ۵۷/۵ درجه سانتی گراد و نسبت آنزیم به سوبسترا ۹۷/۵ به میزان ۴۳/۵۹ درصد مشاهده شد. با توجه به شکل ۲ (C&D) مشاهده شد که در شرایط ثابت (زمان = ۶۰ دقیقه و نسبت آنزیم به سوبسترا = ۹۷/۵) با افزایش دما از ۴۲/۵ تا ۷۲/۵ درجه سانتی گراد میزان شاخص OPA به طور معنی داری از ۲۰ تا ۴۲ درصد افزایش یافت. همچنین همان گونه که در شکل ۲

(E&F) نیز مشاهده می شود با افزایش میزان pH از ۷ تا ۹ در شرایط ثابت (زمان = ۶۰ دقیقه و نسبت آنزیم به سوبسترا = ۹۷/۵) میزان شاخص OPA در محدوده pH=۸ به حداکثر میزان خود رسیده به طوری که نقطه بهینه مرکزی (درجه حرارت = ۵۰ درجه سانتی گراد و pH=۸) نیز در این محدوده مشاهده شد. با افزایش pH به محدوده بالاتر از ۸ در شرایط ثابت (زمان = ۶۰ دقیقه و نسبت آنزیم به سوبسترا = ۹۷/۵) میزان شاخص OPA به طور معنی داری کاهش یافته و تا ۲۳ درصد کاهش یافت.



شکل ۲- (A&B) تاثیر متقابل اثر درجه حرارت و زمان هیدرولیز بر میزان گروه های آمین آزاد محصول هیدرولیز پروتئینی شاه بلوط (pH=۸) و (C&D) تاثیر متقابل اثر درجه حرارت و pH بر میزان گروه های آمین آزاد محصول هیدرولیز پروتئینی شاه بلوط در شرایط ثابت (زمان = ۶۰ دقیقه و نسبت آنزیم به سوبسترا = ۹۷/۵) تاثیر متقابل اثر درجه حرارت و pH بر میزان گروه های آمین آزاد محصول هیدرولیز پروتئینی شاه بلوط در شرایط ثابت (زمان = ۶۰ دقیقه و نسبت آنزیم به سوبسترا = ۹۷/۵) (F&F) تاثیر متقابل اثر درجه حرارت و نسبت آنزیم به سوبسترا بر میزان گروه های آمین آزاد محصول هیدرولیز پروتئینی شاه بلوط (زمان = ۶۰ درجه سانتی گراد و pH=۸) (G&H) تاثیر متقابل اثر pH و زمان هیدرولیز بر میزان گروه های آمین آزاد محصول هیدرولیز پروتئینی شاه بلوط در شرایط ثابت (درجه حرارت = ۵۷/۵ درجه سانتی گراد و نسبت آنزیم به سوبسترا = ۹۷/۵)

جدول ۳- تجزیه واریانس شاخص OPA براساس مدل Quadratic

P-value	F-value	میانگین مربعات	مجموع مربعات	درجه آزادی	منبع‌تغییرات
۰/۰۰۰۲	۱۴/۹۴	۵۷۰/۳۰	۲۸۵۱/۴۸	۵	بلوک
۰/۴۰۷۹	۰/۷۵۳۵	۵۷/۰۶	۷۹۸/۸۲	۱۴	مدل
۰/۰۰۴۴	۱۴/۲۷	۲/۸۸	۲/۸۸	۱	A-درجه حرارت
۰/۱۲۰۱	۲/۹۵	۵۴/۵۱	۵۴/۵۱	۱	B-زمان هیدرولیز
<۰/۰۰۰۰۱	۴۸/۵۳	۱۱/۲۶	۱۱/۲۶	۱	pH-C
۰/۰۲۵۸	۷/۱۱	۱۸۵/۳۲	۱۸۵/۳۲	۱	D-نسبت آنزیم به سوبسترا
۰/۰۰۲۸	۱۶/۶۴	۲۷/۱۵	۲۷/۱۵	۱	AB
۰/۰۰۱۷	۱۹/۴۸	۶۳/۵۴	۶۳/۵۴	۱	AC
۰/۳۲۶۰	۱/۰۸	۷۴/۳۸	۷۴/۳۸	۱	AD
۰/۰۵۰۵	۵/۰۹	۴/۱۲	۴/۱۲	۱	BC
۰/۰۰۰۳	۳۳/۳۵	۱۹/۴۳	۱۹/۴۳	۱	BD
ns/۰/۵۲۹۷	۰/۰۰۰۸	۱۲۷/۳۷	۱۲۷/۳۷	۱	CD
	۰/۳۰۷۷	۰/۰۰۳۲	۰/۰۰۳۲	۱	A2
	۱/۳۹	۱/۱۷	۱/۱۷	۱	B2
	۰/۳۰۷۵	۵/۳۲	۵/۳۲	۱	C2
	۱/۰۴	۱/۱۷	۱/۱۷	۱	D2
	۱/۰۴	۳۴/۳۷	۳۴/۳۷	۹	باقیمانده
		۳/۸۷	۲۳/۲۳	۶	شاخص عدم تطبیق با داده های
		۵/۷۷	۱۱/۱۴	۳	آزمایش
			۳۶۸۴/۶۷	۲۸	خطای کل
				۰/۹۵۸۸	باقیمانده
					ضریب همبستگی
					ضریب تغییرات

با توجه به شکل ۲ (G&H) مشاهده شد که در (زمان = ۶۰ دقیقه و نسبت آنزیم به سوبسترا = ۹۷/۵) با افزایش نسبت آنزیم به سوبسترا میزان شاخص OPA افزایش معنی داری نشان داد. بررسی نتایج ارزیابی میزان گروه های آمین آزاد OPA نشان داد که با افزایش مدت زمان هیدرولیز و غلظت آنزیم، درجه هیدرولیز افزایش می‌یابد و باعث تبدیل پپتیدهای کوچکتر با وزن مولکولی کمتر و زنجیره کوتاهتر می‌شود. بسته به وزن مولکولی، بار و ساختار فضایی زنجیره انتهایی پپتیدهای تولید شده، قدرت به دام انداختن رادیکال های آزاد در آن ها افزایش می‌یابد (Zhang et al., 2014). افزایش بالاتر از ۵/۷ درجه سانتی گراد برای شاخص منجر به کاهش میزان OPA می‌شود. به طور کلی پیشرفت فرآیند هیدرولیز باعث رها شدن پپتیدهای آنتی اکسیدان می‌شود اما افزایش درجه حرارت هیدرولیز و غیر فعال شدن آنزیم، منجر به کاهش میزان آزاد شدن میزان گروه های آمین آزاد محصول هیدرولیز پروتئینی شاه بلوط می‌شود. طاهری و همکاران در سال ۲۰۱۱ با هیدرولیز پروتئین ماهی ساردین توسط آنزیم آلکالاز گزارش کردند که با افزایش دما تا

حدود ۵۰ درجه سانتی گراد (دمای بهینه آنزیم آلکالاز)، قدرت آنتی اکسیدانی افزایش یافته و با افزایش بیشتر دما از میزان آن کاسته می‌شود. کاوه و همکاران (۱۳۹۷) بهینه‌سازی تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان توسط هیدرولیز آنزیمی پروتئین دانه شنبلیله مورد بررسی قرار دادند و دریافتند که با افزایش میزان درجه حرارت میزان شاخص فعالیت آنتی اکسیدانی DPPH و میزان ترکیبات پروتئینی آزاد به طور معنی داری کاهش یافت که با یافته‌های تحقیق مطابقت داشت. پدرام نیا و همکاران (۱۳۹۵) در بهینه‌سازی تولید پروتئین هیدرولیز شده دانه هندوانه نیز به نتایج مشابهی دست یافتند. با افزایش زمان هیدرولیز در مورد آنزیم پپسین و آلکالاز، قدرت چلات‌کنندگی ابتدا افزایش یافته و در ادامه کاهش می‌یابد که با یافته‌های تحقیق حاضر مطابقت داشت. با افزایش زمان هیدرولیز، درجه هیدرولیز افزایش می‌یابد و از شدت و سرعت هیدرولیز، به دلیل کاهش باندهای پپتیدی در دسترس آنزیم، کاهش فعالیت آنزیم و شکل‌گیری ممانعت‌کننده‌ها کاسته می‌شود (Guerar et al., 2002). نتایج تحقیق با یافته‌های مقصودلو و همکاران (۱۳۹۷) در بهینه‌سازی شرایط تولید پپتیدهای زیست‌فعال حاصل از هیدرولیز پروتئینی گرده زنبور عسل توسط آنزیم گوارشی تریپسین و مقایسه آن با ژله رویال به نتایج مشابهی دست یافتند که افزایش مدت زمان هیدرولیز آنزیمی میزان شاخص OPA را کاهش داد که با نتایج تحقیق حاضر نیز همخوانی داشت. به طور کلی با افزایش زمان هیدرولیز بایستی میزان آنزیم را افزایش داد. این موضوع می‌تواند به دلیل تولید ترکیبات بازدارنده ی آنزیمی در زمان هیدرولیز و درجات هیدرولیز بالا باشد که به عنوان سوبسترای رقابتی با پروتئین‌های هیدرولیز نشده عمل می‌کنند و باعث کاهش و یا توقف اثر آنزیم بر روی سوبسترای اصلی می‌شوند (۵).

۳-۳- نتایج آزمون مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH

مطابق با جدول ۳ ملاحظه شد که رابطه DPPH و متغیرهای تحقیق از نوع درجه دوم و با ضریب همبستگی $R^2=0/9716$ می‌باشد. بنابراین مدل به خوبی توانسته است ۹۷/۱۶ درصد از کل تغییرات را در محدوده متغیرهای مورد بررسی را توضیح دهد. شاخص عدم تطبیق با داده‌های آزمایش معنی‌دار شد ($p < 0/0038$). تاثیر متغیر درجه حرارت، pH و نسبت آنزیم به سوبسترا بر میزان شاخص DPPH معنی‌دار می‌باشد و بنابراین مدل ذیل برای پیش‌بینی متغیرهای تحقیق پیشنهاد می‌شود.

$$\text{DPPH} = +58/33 + 14/70A + 2/58B + 0/483C + 4/44D + 2/9AB + 2/0AC + 2/38AD + 1/05BC + 1/71BD - 2/75CD + 13/21A^2 - 13/44B^2 - 7/22C^2 - 0/462D^2$$

با توجه به شکل ۲ مشاهده شد که در شرایط ثابت (pH=8 و نسبت آنزیم/سوبسترا=97/5) با افزایش میزان درجه حرارت هیدرولیز، میزان مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد به طور معنی‌داری افزایش یافت. به طوری در دمای 42/5 درجه میزان مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد تا 43/68 و در دمای 72/5 درجه سانتی گراد میزان مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد تا 66/78 درصد افزایش یافت. نقطه بهینه مرکزی مشاهده شده در شرایط ثابت (pH=8 و نسبت آنزیم/سوبسترا=97/5) در شرایط زمانی 45 دقیقه هیدرولیز و درجه حرارت 57/5 درجه سانتی گراد به میزان 62/96 درصد مشاهده شد. افزایش زمان هیدرولیز از 30 دقیقه تا 60 دقیقه میزان درصد مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد را به طور معنی‌داری افزایش داد. از محدوده 60 دقیقه تا 90 دقیقه کاهش معنی‌داری در میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی با روش DPPH مشاهده شد. نقطه بهینه مرکزی برای شاخص به میزان 65 درصد در شرایط ثابت (pH=8 و نسبت آنزیم/سوبسترا=97/5) و درجه حرارت 57/5 درجه سانتی گراد و زمان 60 دقیقه مشاهده شد. سایر نقاط بهینه نیز در شرایط ثابت (pH=8 و نسبت آنزیم/سوبسترا=97/5) با میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی DPPH معادل 62 (درجه حرارت 57/5 درجه سانتی گراد و زمان هیدرولیز 45 دقیقه)، 60/14 (درجه حرارت 57/5 درجه سانتی گراد و زمان هیدرولیز 75 دقیقه) و 60/07 (درجه حرارت 50 درجه سانتی گراد و زمان هیدرولیز 60 دقیقه)

مشاهده شد. رادیکال DPPH، ماکزیمم جذب را در ۵۱۷ نانومتر داشته و با رو به رو شدن با یک ترکیب دهنده پروتون منجر به کاهش میزان جذب می شود.

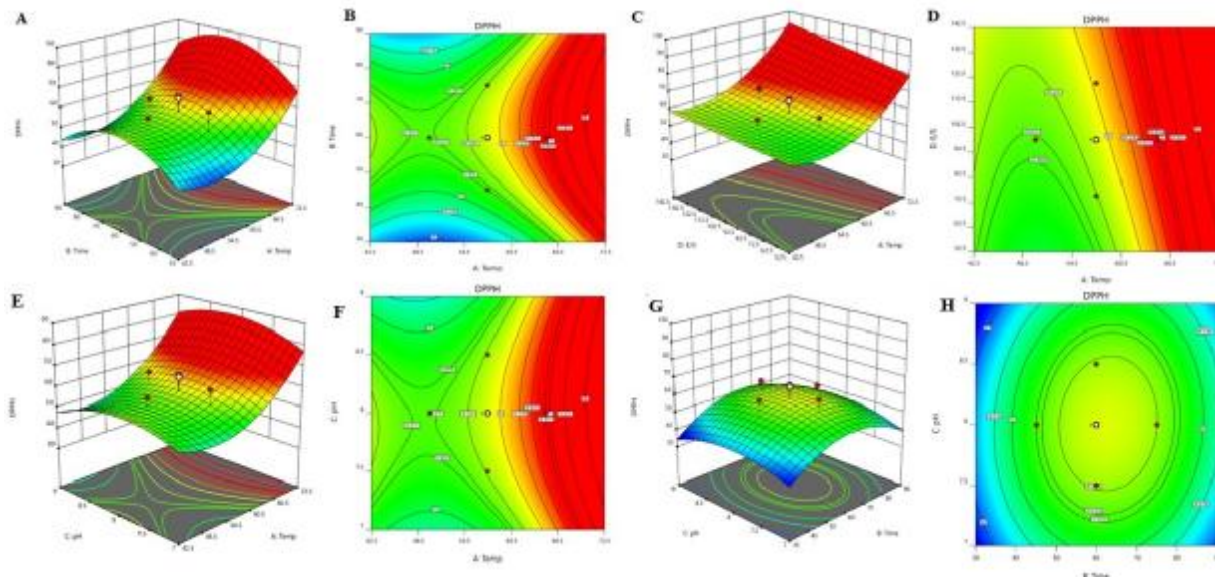
جدول ۴- تجزیه واریانس شاخص DPPH براساس مدل Quadratic

P-value	F-value	میانگین مربعات	مجموع مربعات	درجه آزادی	منبع تغییرات
<۰/۰۰۰۱	۲۲/۰۰	۵۱۸/۱۰	۲۵۹۰/۴۹	۵	بلوک
۰/۱۴۰۱	۲/۶۲	۶۳/۰۱	۸۸۲/۱۳	۱۴	مدل
۰/۰۰۰۷	۲۵/۷۲	۷/۵۰	۷/۵۰	۱	درجه حرارت
۰/۹۲۶۵	۰/۰۰۹۰	۷۳/۶۹	۷۳/۶۹	۱	B- زمان هیدرولیز
<۰/۰۰۰۱	۷۷/۰۹	۰/۰۲۵۸	۰/۰۲۵۸	۱	pH-C
۰/۰۲۵۸	۷/۱۱	۲۲۰/۸۳	۲۲۰/۸۳	۱	D- نسبت آنزیم به سوبسترا
۰/۰۰۲۸	۱۶/۶۴	۴۷/۱۶	۴۷/۱۶	۱	AB
۰/۳۲۶۰	۱۹/۴۸	۴۳/۰۸	۴۳/۰۸	۱	AC
۰/۰۵۰۵	۱/۰۸	۶۰/۹۶	۶۰/۹۶	۱	AD
۰/۰۰۰۳	۵/۰۹	۱۷/۶۷	۱۷/۶۷	۱	BC
۰/۹۷۷۵	۳۳/۳۵	۴۶/۶۹	۴۶/۶۹	۱	BD
۰/۵۹۲۶	۰/۰۰۰۸	۱۲۰/۵۹	۱۲۰/۵۹	۱	CD
۰/۲۶۷۹	۰/۳۰۷۷	۲/۷۵	۲/۷۵	۱	A2
۰/۵۹۲۷	۱/۳۹	۱۵/۰۳	۱۵/۰۳	۱	B2
۰/۰۰۳۸	۰/۳۰۷۵	۴/۳۴	۴/۳۴	۱	C2
	۵۴/۴۵	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۱	D2
		۲/۸۶	۲۵/۷۸	۶	باقیمانده
		۴/۲۶	۲۵/۵۵	۹	شاخص عدم تطبیق با داده های آزمایش
		۰/۰۷۸۲	۰/۲۳۴۶	۳	خطای کل
			۳۴۹۸/۴۰	۲۸	باقیمانده
				۲۸	ضریب همبستگی
				۰/۹۷۱۶	

شواهد بیوشیمیایی، زیستی و بالینی فراوان وجود دارد که نشان می‌دهد واکنش اکسایشی ناشی از رادیکال‌های آزاد در ایجاد بیماری‌های مختلف، تسریع پیری و فساد مواد غذایی دخالت دارد (۲۲) به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدان‌ها در ممانعت از اثرات رادیکال‌های آزاد در ایجاد بیماری‌ها و فساد مواد غذایی، نقش و اثر آنتی‌اکسیدان‌ها مورد توجه محققین، پزشکان و عموم مردم قرار گرفته است و مطالعات ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدان یکی از متداولترین موضوعات مورد بررسی در سال‌های اخیر بوده است (۲۴). پیچیدگی آزمون‌ها و محدودیت‌های بررسی مستقیم سینتیک واکنش ممانعت‌کنندگی آنتی‌اکسیدان‌ها از اکسیداسیون چربی‌ها که اغلب روش‌های دقیق‌تر و مطمئن‌تری می‌باشد موجب شد تا روش‌های ساده‌تر در ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدان‌ها ابداع گردد (۲۵). بر این اساس روش‌های زیادی به شیوه‌های ظرفیت آنتی‌اکسیدان‌ها و موثر، گوناگون در شرایط مختلف بودن آنها را بررسی می‌کند اما اغلب همبستگی قوی بین ظرفیت‌های اندازه‌گیری شده بر روی مواد یکسان به وسیله روش‌های مختلف و بین ظرفیت‌های اندازه‌گیری شده با یک روش در آزمایشگاه‌های مختلف وجود ندارد. به دلیل تنوع مواد فعال، ساز و کار و ویژگی‌های واکنش متفاوت مانند انواع مختلف آنتی‌اکسیدان‌ها، حضور سایر مواد مداخله‌کننده در نمونه، عدم شرکت همه آنتی‌اکسیدان‌های نمونه در واکنش روش مورد استفاده و ... که در واکنش اکسایشی دخالت دارند روش ساده و جهانی برای ارزیابی‌های صحیح و تعیین مقداری آنتی‌اکسیدان‌ها تاکنون به ثبت نرسیده است (۴). به علاوه تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدان‌ها در مواد غذایی با پیچیدگی‌های بیشتری همراه است مانند خصوصیات کلوئیدی نمونه، شرایط و مرحله اکسیداسیون، ویژگی‌های و محل حضور آنتی‌اکسیدان طبیعی ماده مانند رنگ و pH و محل حضور آنتی‌اکسیدان (فاز آبی یا روغنی) که این خود باعث عدم نتیجه‌گیری از یک روش می‌گردد. بنابراین اغلب به منظور اعتبار بخشی به نتایج یک مطالعه از چندین روش برای تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدان‌ها نمونه‌های خوراکی استفاده می‌شود (۸). به این ترتیب بزرگ‌ترین مشکل بر سر راه تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدان‌ها حقیقی نمونه‌های زیستی و خوراکی فقدان یک روش معتبر می‌باشد. تا به حال مقالات مروری بسیاری در این زمینه به چاپ رسیده است ولی با این حال جمع‌بندی یکسانی بدست نیامده است. اساس روش DPPH بر مبنای احیاء رادیکال آزاد (به وسیله آنتی‌اکسیدان‌ها در غیاب سایر رادیکال‌های آزاد در محیط می‌باشد که نتیجه این عمل باعث ایجاد رنگی در محیط می‌شود که شدت آن با دستگاه طیف سنجی قابل اندازه‌گیری است (۱۳). رادیکال DPPH یکی از معدود رادیکال‌های پایدار در دمای اتاق است. زمانی که این ترکیب در مجاورت یک ترکیب هیدروژن‌دهنده مانند یک ضد اکساینده قرار گیرد، یک هیدروژن‌پذیرفته، به ترکیبی پایدار تبدیل شده و در نتیجه مهار رادیکال، تغییر رنگ محسوس از بنفش به زرد و ۵۱۷ نانومتر مشاهده می‌گردد (۱۵). اعتقاد بر این است که نوع ماده اولیه، اختصاصی بودن آنزیم، شرایط هیدرولیز و اندازه، میزان و ساختار اسیدهای آمینه و پپتیدهای تولیدی از فاکتورهای موثر بر فعالیت ضد اکسایش به شمار می‌روند. آنزیم آلکالاز منجر به هضم شدن باندهای پپتیدی از طریق شکستن پیوند میان آمینواسیدهای آب‌گریز مانند لوسین و آمینواسیدهای آروماتیک مانند فنیل آلانین، تریپتوفان و تیروزین با سایر آمینواسیدها می‌گردد و اعتقاد بر این است که گروه فنیل در انتهای باقیمانده زنجیره پپتیدی دارای قابلیت مهار رادیکال می‌باشد (۱۷). در تحقیقی دیگری توسط بر پپتیدهای حاصل از هیدرولیز پروتئین کلزا آنزیم‌های آلکالاز، فلیورزایمیک اندوپپتیداز و با فعالیت اندو و آگرو پپتیداز جهت هیدرولیز، استفاده قرار گرفتند. هیدرولیز شده‌های حاصل در سیستم‌های مدل به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های موثر به ویژه با مهار رادیکال‌های آزاد و عمل به عنوان عامل احیاء کننده عمل نمودند. این اثر وابسته به غلظت و نیز تحت تاثیر نوع آنزیم به کار رفته در تولید پروتئین هیدرولیز شده بود. هیدرولیز شده‌ی حاصل از آنزیم فلیورزایم بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها را در بین تمامی نمونه‌ها از خود نشان داد. نتایج تحقیق نشان داد که افزایش درجه حرارت هیدرولیز تا محدوده ۵۷/۵ درجه سانتی‌گراد میزان شاخص ظرفیت آنتی‌اکسیدان‌ها اندازه‌گیری شده در هر دو روش ABTS و DPPH را افزایش می‌دهد. افزایش درجه حرارت هیدرولیز به دلیل افزایش نرخ هیدرولیز و ایجاد پروتئین‌های زیست‌فعال با خواص آنتی‌اکسیدان‌ها می‌تواند منجر به افزایش میزان مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد در هر دو روش DPPH و

ABTS شود. شعبانی و اکبری آدرگانی (۱۳۹۶) در بهینه‌سازی تولید پروتئین هیدرولیز شده از پنبه دانه به روش سطح پاسخ را بررسی کردند و دریافته‌اند که شرایط بهینه نشان می‌دهد که اثر متغیرهای واکنش بر پاسخ‌های آزمایش معنی‌دار است و افزایش درجه حرارت میزان درجه هیدرولیز را افزایش می‌دهد که با یافته‌های تحقیق حاضر مطابقت داشت. با توجه به این که آنزیم آلکالاز دارای دمای بهینه می‌باشد در نقاط بالاتر از نقاط مرکزی و کاهش میزان نرخ هیدرولیز، میزان شاخص فعالیت آنتی‌اکسیدانی به طور معنی‌داری کاهش یافت که با یافته‌های تحقیق حاضر مطابقت داشت. همچنین با افزایش نسبت آنزیم به سوبسترا و افزایش نسبت تولید آمین‌های آزاد و پپتیدهای زیست‌فعال میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش معنی‌داری را نشان داد اما در درجه هیدرولیز کمتر به جهت افزایش نسبت بیشتر از نقاط مرکزی میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی کاهش معنی‌داری را تجربه نمود. Karamac و همکاران (۲۰۰۲) در بررسی اثرات درجه حرارت و نسبت آنزیم بر سوبسترا بر میزان هیدرولیز پروتئین‌های ایزوله‌نخود با استفاده از تریپسین دریافته‌اند که در مقادیر بالاتر از نقطه بهینه نسبت آنزیم به سوبسترا، خود ترکیبات حاصل از هیدرولیز نقش بازدارندگی در کاهش نرخ هیدرولیز دارد که با یافته‌های تحقیق حاضر مطابقت داشت. مدت زمان هیدرولیز نیز تاثیر معنی‌داری در شرایط ثابت بر میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی DPPH و ABTS داشته و افزایش مدت زمان هیدرولیز به دلیل افزایش تاثیر آنزیم بر سوبسترا و افزایش میزان دسترسی آنزیم در مدت زمان بیشتر، به طور معنی‌داری میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی را افزایش داد. مشکین فر و همکاران (۱۳۹۳) بهینه‌سازی تولید پروتئین هیدرولیز شده از محصولات جانبی صنایع گوشت به کمک روش سطح پاسخ را بررسی نمودند. در این پژوهش، از روش آماری سطح پاسخ جهت بهینه‌سازی شرایط فرآیند هیدرولیز پروتئین روده و معده‌ی گوسفند با استفاده از آنزیم آلکالاز استفاده شد. فاکتورهای مورد بررسی جهت رسیدن به بیشترین میزان درجه هیدرولیز ۳۴-۲۵ آنسون، دما ۱۹۰-۶۵ درجه سانتی‌گراد، دما ۵۲-۴۳ درجه سانتی‌گراد، زمان ۳۰ تا ۹۰ دقیقه بود. نتایج نشان داد که افزایش مدت زمان هیدرولیز از محدوده بهینه درجه هیدرولیز را کاهش می‌دهد که با یافته‌های تحقیق حاضر مطابقت داشت. با توجه به تاثیرات pH در میزان فعالیت آنزیم و درجه هیدرولیز آنزیمی نیز انتظار می‌رفت با تغییرات pH در شرایط ثابت و با کاهش میزان هیدرولیز پروتئین میزان فعالیت آنزیمی نیز کاهش یابد. شرافت و همکاران (۱۳۹۱) برای هیدرولیز آنزیمی ضایعات پس از پخت ماهی تن هوور از آنزیم آلکالاز با فعالیت آنزیمی ۳۵ Au/kg در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد، pH=5.8 و زمان-های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه هر یک در سه مرحله متوالی در غالب طرح آماری کاملاً تصادفی در سه تکرار استفاده کردند که با یافته‌های تحقیق حاضر مطابقت داشت.

¹ tuna Skipjack



شکل ۲- (A&B) تاثیر متقابل اثر زمان هیدرولیز و درجه حرارت هیدرولیز بر میزان فعالیت آنتی اکسیدانی DPPH محصول هیدرولیز پروتئینی شاه بلوط در شرایط ثابت (pH=8) نسبت آنزیم/سوبسترا=97/5 (C&D) تاثیر متقابل اثر pH و درجه حرارت هیدرولیز بر میزان فعالیت آنتی اکسیدانی DPPH محصول هیدرولیز پروتئینی شاه بلوط در شرایط ثابت (زمان هیدرولیز 60 دقیقه و نسبت آنزیم به سوبسترا = 97/5) (E&F) تاثیر متقابل اثر نسبت آنزیم به سوبسترا و درجه حرارت هیدرولیز بر میزان فعالیت آنتی اکسیدانی DPPH محصول هیدرولیز پروتئینی شاه بلوط در شرایط ثابت (زمان هیدرولیز 60 دقیقه و pH معادل 8) (G&H)

۳-۴- نتایج ارزیابی طول زنجیره پروتئینی

با توجه به جدول ۵ ملاحظه شد که رابطه طول زنجیره پروتئینی و متغیرهای تحقیق از نوع درجه دوم و با ضریب همبستگی 0/9071 $R^2=$ می باشد. بنابراین مدل به خوبی توانسته است 90/71 درصد از کل تغییرات را در محدوده متغیرهای مورد بررسی را توضیح دهد. شاخص عدم تطبیق با داده های آزمایش معنی دار شد ($p < 0/0038$). با توجه به جدول واریانس 4 تاثیر متغیرهای pH و نسبت آنزیم به سوبسترا بر میزان شاخص طول زنجیره پروتئینی معنی دار می باشد و بنابراین مدل ذیل برای پیش بینی متغیرهای تحقیق پیشنهاد می شود.

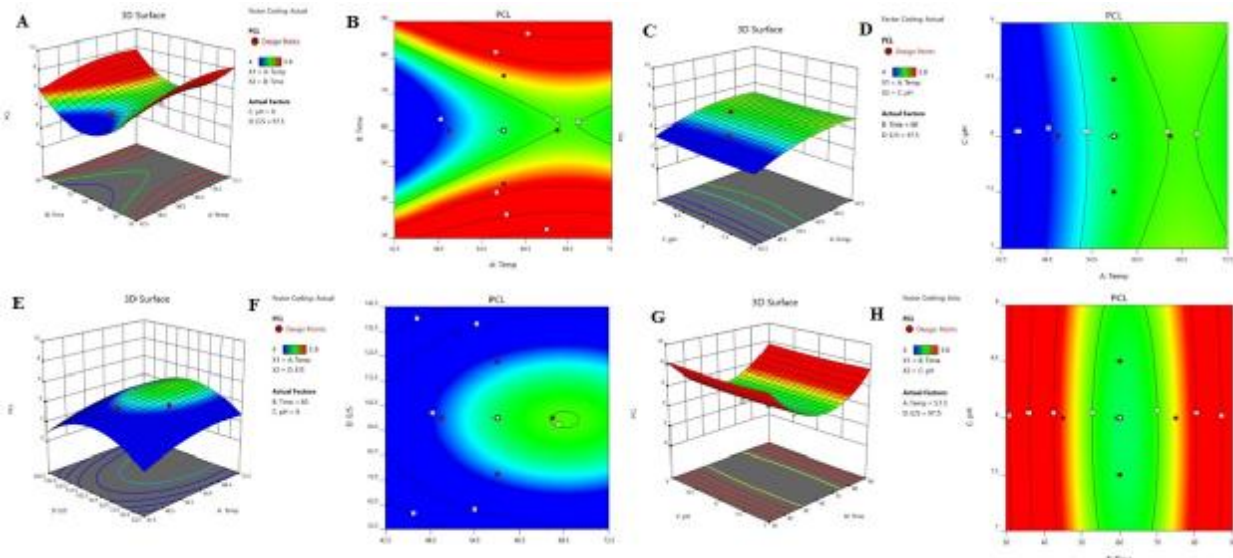
$$PCL = +4/75 + 0/8661A - 0/3080B + 0/0345C + 0/0552D + 0/257AB + 2/00AC + 0/38AD + 1/05BC + 1/71BD - 2/75CD + 13/21A^2 - 13/44B^2 - 7/22C^2 - 0/0462D^2$$

نقطه بهینه مرکزی برای شاخص به میزان 4/2 در شرایط ثابت (pH=8 و نسبت آنزیم/سوبسترا=97/5) و درجه حرارت 57/5 درجه سانتی گراد و زمان 60 دقیقه مشاهده شد. سایر نقاط بهینه نیز در شرایط ثابت (pH=8 و نسبت آنزیم/سوبسترا=97/5) با میزان طول زنجیره پروتئینی معادل 5 (درجه حرارت 57/5 درجه سانتی گراد و زمان هیدرولیز 60 دقیقه)، 60/14 (درجه حرارت 65 درجه سانتی گراد و زمان هیدرولیز 75 دقیقه) و 60/07 (درجه حرارت 50 درجه سانتی گراد و زمان هیدرولیز 60 دقیقه) مشاهده شد. با توجه به شکل 3 مشاهده شد که در شرایط ثابت (pH=8 و نسبت آنزیم/سوبسترا=97/5) با افزایش میزان زمان هیدرولیز، میزان طول زنجیره پروتئینی به طور معنی داری کاهش یافت. به طوری در دمای 42/5 درجه میزان مهارکنندگی رادیکال های آزاد تا 43/68 و در دمای 72/5 درجه سانتی گراد میزان طول زنجیره پروتئینی معادل 4/2 مشاهده شد. نقطه بهینه مرکزی مشاهده شده در شرایط ثابت (pH=8)

نسبت آنزیم/سوبسترا=۹۷/۵) در شرایط زمانی ۴۵ دقیقه هیدرولیز و درجه حرارت ۵۷/۵ درجه سانتی گراد به میزان ۴/۲ درصد مشاهده شد. افزایش زمان هیدرولیز از ۳۰ دقیقه تا ۶۰ دقیقه میزان طول زنجیر پروتئینی را به طور معنی داری کاهش نشان داد. از محدوده ۶۰ دقیقه تا ۹۰ دقیقه افزایش معنی داری در میزان طول زنجیر پروتئینی مشاهده شد. نقطه بهینه مرکزی برای شاخص به میزان ۴/۲ در شرایط ثابت (pH=۸ و نسبت آنزیم/سوبسترا=۹۷/۵) و درجه حرارت ۵۷/۵ درجه سانتی گراد و زمان ۶۰ دقیقه مشاهده شد. با توجه به شکل ۳ (C&D) مشاهده شد که در شرایط ثابت (pH=۸ و نسبت آنزیم/سوبسترا=۹۷/۵) با افزایش میزان درجه حرارت هیدرولیز، طول زنجیره پروتئینی به طور معنی داری افزایش و سپس کاهش یافت. افزایش زمان هیدرولیز از ۳۰ دقیقه تا ۶۰ دقیقه میزان طول زنجیره پروتئینی را به طور معنی داری افزایش داد. از محدوده ۶۰ دقیقه تا ۹۰ دقیقه کاهش معنی داری در میزان طول زنجیره پروتئینی مشاهده شد. به طور کلی طول زنجیره پروتئینی از ۶/۵-۳/۵ کاهش پیدا می کند. نسبت آنزیم/سوبسترا تاثیرات معنی داری بر میزان طول زنجیره پروتئینی داشته و تا محدوده ۹۷/۵ طول زنجیره پروتئینی کاهش و سپس افزایش می یابد. به نظر می رسد در طول فاز اولیه هیدرولیز بخشی از پروتئین های اولیه هیدرولیز می شود و طول زنجیره پپتیدی کاهش می یابد، اما با گذشت زمان غلظت زیاد این پپتیدها در مخلوط واکنش سرعت هیدرولیز را کاهش و طول زنجیره پپتیدی را افزایش می دهد(۲۱).

جدول ۵- تجزیه واریانس شاخص PCL براساس مدل Quadratic

P-value	F-value	میانگین مربعات	مجموع مربعات	درجه آزادی	منبع تغییرات
۰/۰۰۹۹	۵/۵۸	۰/۵۵۰۵	۲/۷۵	۵	بلوک
۰/۶۳۲۹	۰/۲۴۶۵	۰/۳۱۳۳	۴/۳۹	۱۴	مدل
۰/۰۰۲۷	۱۸/۲۸	۰/۰۱۳۸	۰/۰۱۳۸	۱	درجه حرارت
۰/۶۴۵۲	۰/۲۲۸۹	۱/۰۳	۱/۰۳	۱	B- زمان هیدرولیز
۰/۴۸۲۵	۰/۵۴۲۴	۰/۰۱۲۹	۰/۰۱۲۹	۱	pH-C
۰/۶۱۱۶	۰/۲۷۹۱	۰/۰۳۰۵	۰/۰۳۰۵	۱	D- نسبت آنزیم به سوبسترا
۰/۶۲۵۴	۰/۲۵۷۷	۰/۰۱۵۷	۰/۰۱۵۷	۱	AB
۰/۷۳۱۳	۰/۱۲۶۵	۰/۰۱۴۵	۰/۰۱۴۵	۱	AC
۰/۶۱۲۳	۰/۲۷۸۱	۰/۰۰۷۱	۰/۰۰۷۱	۱	AD
۰/۲۰۷۶	۱/۸۸	۰/۰۱۵۶	۰/۰۱۵۶	۱	BC
۰/۹۱۸۶	۰/۰۱۱۱	۰/۰۱۵۶	۰/۰۱۵۶	۱	BD
۰/۷۷۸۳	۰/۰۸۴۸	۰/۰۰۰۶	۰/۰۰۰۶	۱	CD
۰/۰۱۱۳	۱۰/۷۱	۰/۰۰۴۸	۰/۰۰۴۸	۱	A2
۰/۸۹۷۹	۰/۰۱۷۵	۰/۶۰۱۶	۰/۶۰۱۶	۱	B2
۰/۱۱۶۳	۳/۱۰	۰/۰۰۱۰	۰/۰۰۱۰	۱	C2
۰/۰۰۷۲	۵۴/۴۵	۰/۱۷۴۲	۰/۱۷۴۲	۱	D2
		۰/۰۵۶۲	۰/۴۴۹۵	۶	باقیمانده
		۰/۰۸۸۴	۰/۴۴۲۰	۹	شاخص عدم تطبیق با داده های آزمایش
		۰/۰۰۲۵	۰/۰۰۷۵	۳	خطای کل
			۷/۵۹	۲۸	باقیمانده
				۲۸	ضریب همبستگی
				۰/۹۷۱۶	



شکل ۳- (A&B) تاثیر متقابل اثر زمان هیدرولیز و درجه حرارت هیدرولیز بر میزان طول زنجیر پروتئینی محصول هیدرولیز پروتئینی شاه بلوط در شرایط ثابت (pH=8) و نسبت آنزیم/سویسترا=9۷/۵ (C&D) تاثیر متقابل اثر pH و درجه حرارت هیدرولیز بر میزان طول زنجیر پروتئینی محصول هیدرولیز پروتئینی شاه بلوط در شرایط ثابت (زمان هیدرولیز ۶۰ دقیقه و نسبت آنزیم به سویسترا و درجه حرارت هیدرولیز بر میزان طول زنجیر پروتئینی محصول هیدرولیز پروتئینی شاه بلوط در شرایط ثابت (زمان هیدرولیز ۶۰ دقیقه و pH معادل ۸) (E&F) تاثیر متقابل اثر pH و مدت زمان هیدرولیز بر میزان طول زنجیر پروتئینی محصول هیدرولیز پروتئینی شاه بلوط در شرایط ثابت (درجه حرارت هیدرولیز معادل ۵۷/۵ و نسبت آنزیم به سویسترا معادل ۹۷/۵)

در مقادیر آنزیمی پایین با کاهش درجه هیدرولیز طول زنجیره پپتیدی بیشتر می شود که علت آن مربوط به ممانعت آنزیمی است که احتمالاً آنزیم ها خودشان را هیدرولیز می کنند (۲۲). در یک بررسی داورنیا و همکاران (۱۳۹۱) در بررسی تعیین طول زنجیره پپتیدی پروتئین هیدرولیز شده امعاء و احشاء ماهی تون زرد باله با آنزیم نیوتراز به نتایج مشابهی دست یافتند. آن ها دریافتند که مقادیر آنزیمی پایین با کاهش درجه هیدرولیز طول زنجیره پپتیدی بیشتر می شود که با یافته های تحقیق حاضر مطابقت داشت. بررسی اثر آنزیم بر میانگین تقریبی طول زنجیر پپتیدی به دست آمده از هیدرولیز نشان داد که این صفت تحت تاثیر درجه حرارت قرار ندارد بلکه، تابع درجه دوم فعالیت آنزیم و زمان اثر آن می باشد درجه هیدرولیز معمولاً بین صفر تا حدود ۱۵ درصد متغیر است و این میزان هیدرولیز سبب افزایش حلالیت تا حدود ۹۰ درصد می شود. بنابراین مقدار عددی طول زنجیر پپتیدی که به روش الدرنیسن و اولسن محاسبه می شود می تواند حداقل ۵ الی ۶ باشد. از آن جا که مدل به دست آمده مقادیر را به طور متوسط ۱۸ واحد کمتر تخمین می زند و برای جلوگیری از حصول جواب های خارجی، عدد ۱۸/۰۵ (متوسط اختلاف کمترین و بیشترین تخمین زده از مقادیر واقعی) به عرض از مبدا مدل به دست آمده اضافه شده و منحنی مربوطه رسم گردید. با توجه به شکل های مربوطه، طول تقریبی زنجیره از کمتر از ۱۰ تا حدود ۸۰ متغیر است. کمترین طول زنجیره در فعالیت های بالای آنزیمی و یا زمان های طولانی مشاهده می شود. سرعت شکستن مولکول پروتئین و کاهش اندازه مولکول ها در مراحل ابتدایی واکنش (تا حدود ۵۰ دقیقه) و تا فعالیت آنزیمی تقریباً ۲۰۰ واحد تیروزین زیاد است که نشان می دهد بخش اصلی عملکرد آنزیم در سیستم پروتئینی در این فاصله زمانی اتفاق می افتد بنابراین، چنان چه پروتئین به مدت طولانی در مجاورت آنزیم قرار بگیرد ممکن است دچار تجزیه شدید شده و هیدرولیزهای به دست آمده خواص مطلوب عمل کنندگی خود را ادست دهند. به طور کلی با افزایش فعالیت آنزیم های پروتئولیتیک می توان راندمان تولید نیترژن محلول (پروتئین

محلول) را افزایش داد. چنانچه غلظت سوبسترا از حد خاصی تجاوز کند (بالتر از ۸ درصد) از سرعت هیدرولیز کاسته می‌شود. علاوه بر فعالیت آنزیم، شرایط عمومی واکنش، نیز بر میزان حلالیت، درجه حرارت هیدرولیز و طول زنجیره پپتیدی هیدرولیز شده ها موثر می‌باشد. معمولاً گروه وسیعی از پپتیدها با وزن مولکولی متفاوت شکل می‌گیرند ولی در محاسبه ها از متوسط طول زنجیره ها استفاده می‌شود. معتمدزادگان و همکاران در سال ۱۳۸۸ با بررسی اثر آنزیم پاپائین بر میانگین تقریبی طول زنجیر پپتیدی حاصل از هیدرولیز ماعی کلیکا نشان دادند که این صفت تحت تاثیر درجه حرارت قرار ندارد بلکه، تابع درجه دوم فعالیت آنزیم و زمان اثر آن می‌باشد. در یک پژوهش انجام شده در سال ۲۰۰۲ با هیدرولیز اسکلت ماهی کاد توسط پنج نوع آنزیم آلکالاز باکتریایی، نیوتراز، پروتامکس، تریپسین خوگ و تریپسین کاد مشخص گردید که پروتئاز باکتریایی راندمان بیشتری در محلول سازی پروتئین ها داشته ولی تا حدی طعم تلخ غالب می‌گردد. هیدرولیزهای به دست آمده به دلیل کاهش وزن مولکولی معمولاً ضریب هضم و جذب بالاتری نسبت به پروتئین اولیه دارند.

۳-۵- بهینه سازی شرایط استخراج پروتئین شاه بلوط

پس از تجزیه و تحلیل داده ها، نرم افزار شرایط بهینه جهت دستیابی به بیشترین قدرت احیاء کنندگی و مهارادیکال DPPH و درصد هیدرولیز پروتئینی OPA، در درجه حرارت ۵۷/۵ درجه سانتی گراد، زمان هیدرولیز ۶۰ دقیقه، pH معادل ۸، نسبت آنزیم به سوبسترا ۹۷/۵ مشخص کرد، در شرایط ذکر شده هیدرولیز انجام شد و سپس نقطه بهینه با در نظر گرفتن هدف با حداکثر میزان فعالیت آنتی اکسیدانی (DPPH) و همچنین OPA در شرایط درجه حرارت ۵۷/۵، زمان هیدرولیز ۶۰ دقیقه، pH معادل ۸، نسبت آنزیم به سوبسترا معادل ۹۷/۵۰ توسط نرم افزار پیشنهاد شد. جهت ارزیابی اعتباری مدل آزمون، یک آزمایش اضافه تحت شرایط مذکور انجام شد که در آن میزان DPPH معادل ۵۶/۵۸، میزان OPA معادل ۳۲/۲۶ و مقدار PCL معادل ۴/۷۴ به دست آمد. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که میزان پیش بینی شده مدل با مقداری که به صورت آزمایشی به دست آمده است، تطابق دارد. این شرایط بیانگر آن است که مدل به صورت مناسبی می‌تواند اثر متغیرهای درجه حرارت هیدرولیز، زمان هیدرولیز، نسبت آنزیم به سوبسترا و pH را بر میزان OPA، DPPH و PCL نشان دهد.

۳-۶- قابلیت زنده مانی باکتری های آغازگر ماست

با توجه به جدول ۳ مشاهده شد که تاثیر تیمار بر میزان شاخص قابلیت زنده مانی باکتری های آغازگر ماست تیمارهای ماست در سطح ۰/۰۵ درصد معنی دار بود ($p < 0.05$). به طور کلی در طی زمان نگهداری قابلیت زنده مانی باکتری های آغازگر ابتدا افزایش و سپس کاهش معنی داری نشان داد باکتری های لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه بولگاریکوس، میکروارگانسیم های گرمادوستی هستند که در زیر میکروسکوپ معمولاً به اشکال میله ای کوتاه، و گاهی در فرم های بلندتر نیز دیده می‌شوند. این باکتری های گرم مثبت، غیر اسپورزا، بدون حرکت و کاتالاز منفی هستند که تحت شرایط شرح داده شده در استاندارد ملی ایران به شماره ۷۷۱۴ بر روی محیط کشت MRS آگار با pH اسیدی، کلنی های عدسی شکل به قطر ۱ تا ۳ میلی متر اغلب با لبه های مشخص ایجاد می‌کنند. باکتری های استرپتوکوکوس ترموفیلوس، میکروارگانسیم های گرمادوستی هستند که در زیر میکروسکوپ به صورت یاخته های کروی و یا بیضی شکل به قطر ۰/۷ تا ۰/۳ میکرون با آرایش دیپلوکوکسی یا زنجیره های بلند می‌باشند. این باکتری ها گرم مثبت، بدون حرکت و کاتالاز منفی هستند و تحت شرایط شرح داده شده در استاندارد ملی ایران به شماره ۷۷۱۴ بر روی محیط کشت M17 آگار، کلنی هایی به قطر ۲ میلی متر ایجاد می‌کنند. قابلیت زنده مانی باکتری های آغازگر ماست در روزهای صفر، هفتم و یازدهم تولید طی نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی گراد انجام پذیرفت. در مقادیر پروتئین تا میزان ۳ درصد شاه بلوط به دلیل این که این پروتئین می‌تواند منبعی برای تغذیه باکتری های آغازگر باشد، این می‌تواند به افزایش بقا و ماندگاری آنها کمک کند اما در مقادیر بالای ۴ و ۵ درصد استفاده به دلیل این

که فشار اسمزی محیط به طور معنی داری افزایش می یابد این مساله می تواند بر شرایط فیزیولوژیکی و ماندگاری باکتری های اثرات نامطلوبی داشته باشد و از طرفی دیگر با افزایش زمان نگهداری نیز این مساله را تشدید نموده و باعث کاهش بقای باکتری های پروبیوتیک شود که به دلیل افزایش میزان متابولیت ها در محیط ها و همچنین کاهش میزان مواد مغذی در ماست می باشد. در این راستا نیز تحقیقات مشابهی نیز وجود داشت.

جدول ۶- قابلیت زنده مانگی (کلونی) در باکتری استرپتوکوکوس ترموفیلوس در نمونه های ماست غنی شده با پروتئین هیدرولیز شده شاه بلوط

کد تیمار	روز اول	روز هفتم	روز چهاردهم	روز بیست و یکم
ماست با ۱ درصد پروتئین شاه بلوط	۶/۹۱ ± ۰/۰۱ _b	۶/۹۵ ± ۰/۰۱ _{ab}	۷/۱ ± ۰/۰۲ _a	۶/۸ ± ۰/۰۱ _{bc}
ماست با ۲ درصد پروتئین شاه بلوط	۶/۹۱ ± ۰/۰۱ _b	۶/۹۹ ± ۰/۰۳ _{ab}	۷/۶ ± ۰/۰۲ _a	۷/۰ ± ۰/۰۱ _a
ماست با ۳ درصد پروتئین شاه بلوط	۶/۹۱ ± ۰/۰۱ _b	۶/۲ ± ۰/۰۱ _{ab}	۷/۱ ± ۰/۰۲ _{ab}	۶/۸ ± ۰/۰۱ _{bc}
ماست با ۴ درصد پروتئین شاه بلوط	۶/۹۱ ± ۰/۰۱ _b	۶/۱ ± ۰/۰۱ _{ab}	۶/۸ ± ۰/۰۲ _{bc}	۶/۴ ± ۰/۰۱ _e
ماست با ۵ درصد پروتئین شاه بلوط	۶/۹۱ ± ۰/۰۱ _b	۵/۷۸ ± ۰/۰۱ _c	۶/۵۵ ± ۰/۰۲ _c	۶/۲۳ ± ۰/۰۱ _d

• داده ها میانگین ± انحراف معیار می باشد.

• حروف مختلف نشان دهنده اختلاف معنی دار بین میانگین های تحقیق می باشد.

جدول ۷- قابلیت زنده مانگی (کلونی) در باکتری لاکتوباسیلوس بولگاریکوس در نمونه های ماست غنی شده با پروتئین هیدرولیز شده شاه بلوط

کد تیمار	روز اول	روز هفتم	روز چهاردهم	روز بیست و یکم
ماست با ۱ درصد پروتئین شاه بلوط	۶/۷۲ ± ۰/۰۱ _b	۶/۹۵ ± ۰/۰۱ _{ab}	۷/۱ ± ۰/۰۲ _a	۶/۸ ± ۰/۰۱ _{bc}
ماست با ۲ درصد پروتئین شاه بلوط	۶/۷۲ ± ۰/۰۱ _b	۶/۹۹ ± ۰/۰۳ _a	۷/۶ ± ۰/۰۲ _a	۷/۰ ± ۰/۰۱ _a
ماست با ۳ درصد پروتئین شاه بلوط	۶/۷۲ ± ۰/۰۱ _b	۷/۲ ± ۰/۰۱ _{ab}	۷/۱ ± ۰/۰۲ _{ab}	۶/۸ ± ۰/۰۱ _{bc}
ماست با ۴ درصد پروتئین شاه بلوط	۶/۷۲ ± ۰/۰۱ _b	۷/۰ ± ۰/۰۱ _{ab}	۶/۸ ± ۰/۰۲ _{bc}	۶/۴ ± ۰/۰۱ _c
ماست با ۵ درصد پروتئین شاه بلوط	۶/۷۲ ± ۰/۰۱ _b	۶/۷۸ ± ۰/۰۱ _c	۶/۵۵ ± ۰/۰۲ _c	۶/۲۳ ± ۰/۰۱ _d

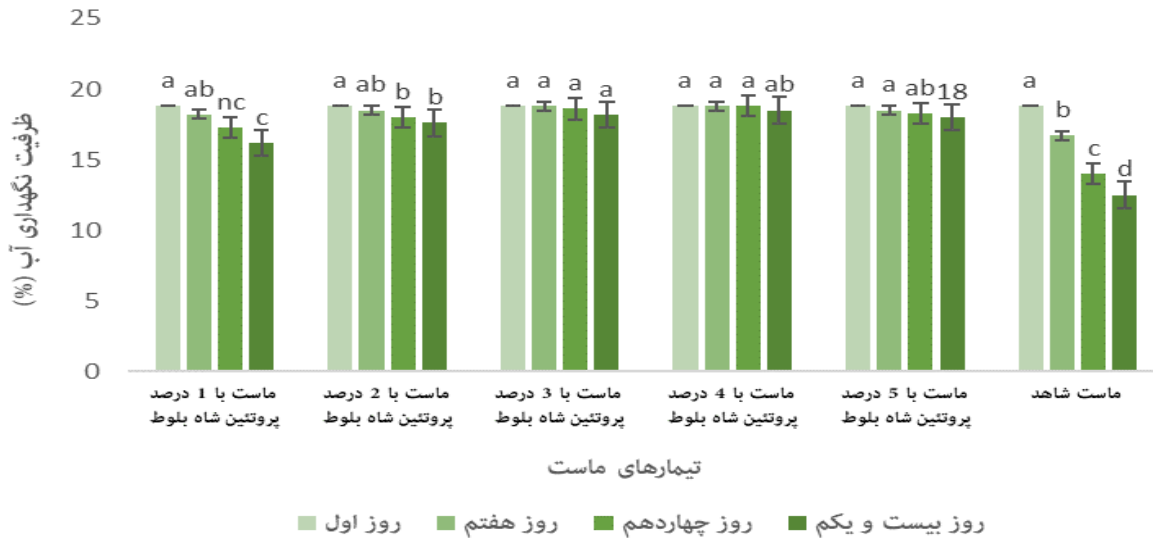
• داده ها میانگین ± انحراف معیار می باشد.

• حروف مختلف نشان دهنده اختلاف معنی دار بین میانگین های تحقیق می باشد.

Samadi Varedesara و همکاران در سال ۲۰۲۱ در بررسی اثر پروتئین هیدرولیز شده دانه انگور بر روی خصوصیات ماست همزده و قابلیت زنده مانگی باکتری های پروبیوتیک به نتایج مشابهی دست یافتند. آن ها دریافتند که مقادیر بالای پروتئین هیدرولیز شده در محیط می تواند برای باکتری های پروبیوتیک ایجاد مسمومیت محیطی نموده و باعث کاهش بقای باکتری های پروبیوتیک شود که با یافته های تحقیق حاضر نیز مطابقت داشت.

۳-۷- ارزیابی درصد ماده خشک تیمارهای ماست

با توجه به شکل ۴ مشاهده شد که استفاده از پروتئین های شاه بلوط میزان درصد ماده خشک تیمارهای ماست را به طور معنی داری افزایش داد به طوری که بالاترین میزان درصد ماده خشک به تیمار ۵ درصد پروتئین هیدرولیز شده شاه بلوط و کمترین آن به ۱ درصد پروتئین هیدرولیز شده شاه بلوط تعلق داشت ($p < 0.05$).



شکل ۴- مقایسه میانگین شاخص ماده خشک تیمارهای ماست فراسودمند کم چرب با استفاده از پروتئین های هیدرولیز شده شاه بلوط

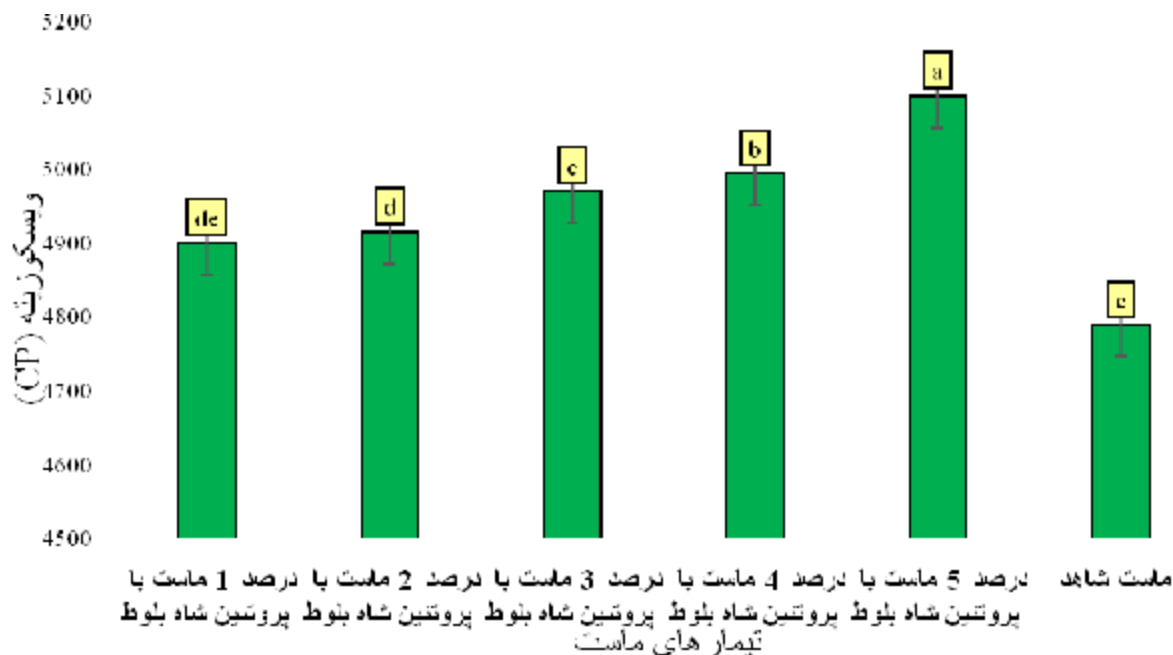
ماده خشک به کلیه ترکیبات موجود در محصول به جز رطوبت آن گفته می شود. این ماده خشک ترکیبی از چربی، پروتئین ها، کربوهیدرات ها، نشاسته، مواد افزودنی، نشاسته، مواد افزودنی، نگهدارنده، مواد رنگ دهنده و شیر خشک می باشد. طبیعتاً با این تعریف افزایش درصد ماده خشک با افزایش میزان درصد پروتئین های هیدرولیز شده شاه بلوط نیز دور از انتظار نبود. در این راستا نیز تحقیقات مشابهی نیز وجود داشت. امیری رفتنی و همکاران در سال ۱۳۹۵ در بررسی تاثیر پروتئین هیدرولیز شده ماهی مرکب^۱ بر خصوصیات کیفی ماست قالبی کمچرب به نتایج مشابهی دست یافتند. آن ها دریافتند که پروتئین ها هیدرولیز شده میزان درصد ماده خشک را افزایش می دهد که با یافته های تحقیق حاضر مطابقت داشت. غلامی و همکاران در سال ۱۳۹۸ در بررسی تاثیر پروتئین هیدرولیز شده سبوس برنج رقم طارم روی خواص فیزیکی شیمیایی ماست کم چرب نیز به نتایج مشابهی در خصوص افزایش میزان درصد ماده خشک با استفاده از سبوس برنج رقم طارم دست یافتند که با یافته های تحقیق حاضر مطابقت داشت.

۳-۸- ارزیابی ویسکوزیته تیمارهای ماست

با توجه به شکل ۵ مشاهده شد که اختلافات معنی داری بین میزان ویسکوزیته تیمار ماست شاهد مطابق با استاندارد ملی با سایر تیمارهای ماست فراسودمند وجود داشت و با افزایش میزان درصد استفاده از پروتئین های هیدرولیز شده شاه بلوط میزان ویسکوزیته تیمارهای ماست افزایش معنی داری را نشان داد ($p < 0.05$). خصوصیات بافتی ماست همچون جدا شدن سرم و ویسکوزیته از عوامل تعیین کننده کیفیت ماست و مقبولیت از طرف مصرف کنندگان می باشد. از عوامل تاثیر گذار در میزان سینرسیس و ویسکوزیته ماست می توان به میزان ماده خشک، هموژنیزاسیون، تیمار حرارتی، دمای انکوباسیون و ... اشاره کرد. نتایج این مطالعه نشان داد که با افزایش سطح پروتئین شاه بلوط، ویسکوزیته نمونه های ماست افزایش یافت. می تواند به این دلیل باشد که پروتئین شاه بلوط با ایجاد اتصالات با پروتئین های کازئینی شیر در نمونه ها باعث ویسکوزیته می شود. که احتمالاً به دلیل جذب آب ماست توسط پروتئین های

¹ *Sepia Paraonis*

شاه بلوط می باشد که به دلیل انجام فعالیت اسمزی، آب میان بافتی را کاهش داده در نتیجه ویسکوزیته نمونه ها افزایش می یابد که در این راستا نیز تحقیقات مشابهی وجود داشت.



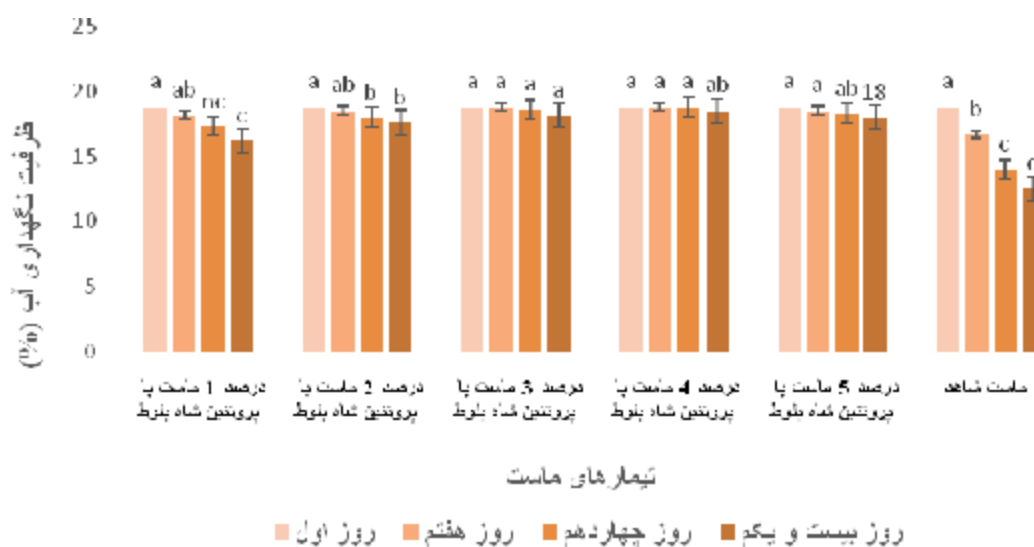
شکل ۵- مقایسه میانگین شاخص ویسکوزیته تیمارهای ماست فراسودمند کم چرب با استفاده از پروتئین های هیدرولیز شده شاه بلوط

علیزاده و همکاران (۱۳۸۸) در یک بررسی تاثیر پروتئین های شیر تغلیظ شده به روش اولترافیلتراسیون بر خواص شیمیایی و حسی ماست را بررسی نمودند و نتایج نشان داد که حضور پروتئین های شیر تغلیظ شده یا باند کردن کازئین موجود نمونه ها باعث افزایش ویسکوزیته تیمارهای ماست شدند که با یافته های تحقیق حاضر مطابقت داشت. رفتنی امیری و همکاران (۱۳۹۵) در بررسی تاثیر پروتئین هیدرولیز شده ماهی مرکب بر خصوصیات کیفی ماست قالبی کم چرب نیز به نتایج مشابهی دست یافتند. آن ها دریافتند که استفاده از پروتئین های هیدرولیز شده می تواند میزان ویسکوزیته تیمارهای ماست را افزایش یابد که با یافته های تحقیق حاضر مطابقت داشت.

۳-۹- نتایج ارزیابی ظرفیت نگهداری آب

با توجه به شکل ۶ مشاهده شد که اختلاف معنی داری بین میزان میانگین شاخص ظرفیت نگهداری آب تیمارهای ماست در مقادیر ۱ تا ۳ درصد اختلافات معنی داری نشان نمی دهد ($p > 0.05$) اما در مقادیر ۴ و ۵ درصد اختلافات معنی داری با تیمار شاهد نشان دادند ($p < 0.05$). به کلی با افزایش میزان درصد پروتئین هیدرولیز شده شاه بلوط شاخص ظرفیت نگهداری تیمارهای ماست با افزایش معنی داری مواجه بود. در طی زمان نگهداری میزان ظرفیت نگهداری آب در تیمارهای ماست به طور معنی داری کاهش یافت ($p < 0.05$). میزان این کاهش در تیمار شاهد بیشتر از تیمارهای با مقادیر پروتئین شاه بلوط به میزان ۱ تا ۳ درصد بود. بیشترین میزان شاخص ظرفیت نگهداری آب به تیمار ۳ درصد و کمترین آن به تیمار ماست دارای ۵ درصد پروتئین هیدرولیز شده تعلق داشت ($p < 0.05$). با توجه به شکل ۶ مشاهده شد که اختلافات معنی داری بین میزان میانگین ظرفیت نگهداری تیمارهای ماست فراسودمند کم چرب با تیمار شاهد در روز تولید وجود نداشت ($p < 0.05$). در طی دوره نگهداری میزان شاخص ظرفیت نگهداری

تیمارهای ماست فراسودمند کم چرب کاهش معنی داری نشان می دهد که به دلیل برهم خوردن تعادل الکتروستاتیکی و همچنین برهم خوردن نظم میسل های کازئینی می باشد. استفاده از پروتئین هیدرولیز شده شاه بلوط در مقادیر یک تا ۳ درصد به جهت آبدوستی به حفظ ساختارهای میسلی کمک نموده و می تواند میزان درصد آب اندازی را به طور معنی داری کاهش دهد اما در تیمارهای ماست با مقادیر ۴ و ۵ درصد پروتئین هیدرولیز شده شاه بلوط به دلیل اجتماع بیشتر ترکیبات پروتئینی در ساختار ماست، تعادل آبدوستی و آبگریزی ایجاد شده در ساختار ماست را کاهش داده و از طرفی با ایجاد آگلومراسیون میزان درصد به دام اندازی در این تیمارهای ماست از تیمار ماست شاهد نیز کاهش می یابد که تحقیقات مشابهی نیز در این راستا نیز وجود داشت. هادی و همکاران در سال ۱۳۹۹ در بررسی اثر استفاده از مقادیر مختلف ایزوله پروتئین آب پنیر و صمغ خرنوب بروی ویژگی های کیفی ماست قالبی بدون چربی به نتایج مشابهی دست یافتند. آن ها دریافتند که استفاده از مقادیر بالای ایزوله پروتئینی می تواند میزان شاخص قابلیت نگهداری آب را به طور معنی داری کاهش دهد که با یافته های تحقیق حاضر مطابقت داشت.

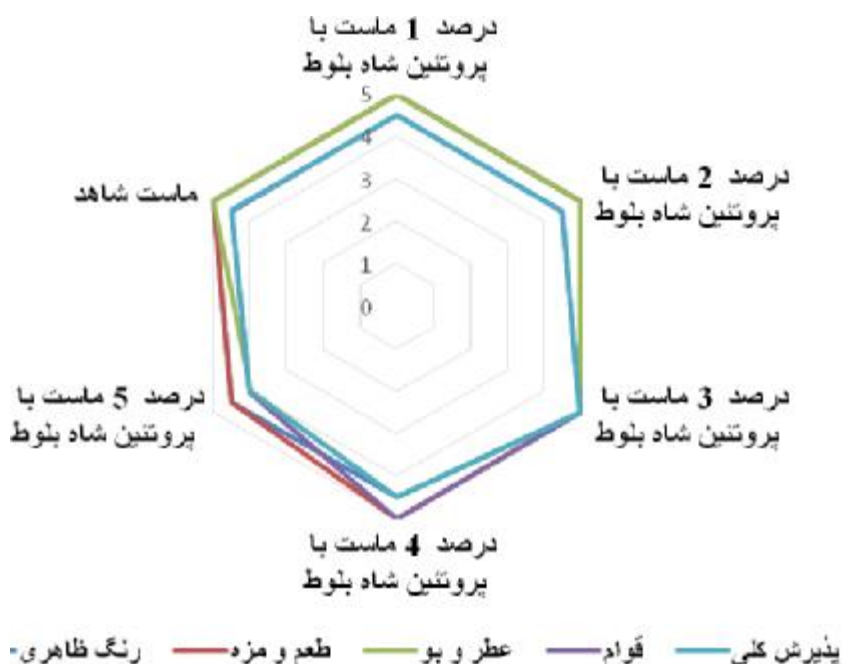


شکل ۶- مقایسه میانگین ظرفیت نگهداری تیمارهای ماست فراسودمند کم چرب با استفاده از پروتئین های هیدرولیز شده شاه بلوط در طی زمان نگهداری

۳-۱۰- ارزیابی حسی

ارزیابی نتایج حسی نشان داد که اختلافات معنی داری بین میزان شاخص رنگ ظاهری تیمارهای ماست از نظر ارزیابی ها تا میزان استفاده ۳ درصد از پروتئین های هیدرولیز شده شاه بلوط وجود نداشت ($p < 0.05$). اما در مقادیر استفاده از پروتئین های هیدرولیز شده شاه بلوط به میزان ۴ و ۵ درصد میزان مطلوبیت رنگ ظاهری تیمارهای ماست کاهش معنی داری نشان داد ($p < 0.05$). ارزیابی نتایج حسی نشان داد که اختلافات معنی داری بین میزان شاخص طعم و مزه تیمارهای ماست از نظر ارزیابی ها تا میزان استفاده ۳ درصد از پروتئین های هیدرولیز شده شاه بلوط وجود نداشت ($p < 0.05$). اما در مقادیر استفاده از پروتئین های هیدرولیز شده شاه بلوط به میزان ۴ و ۵ درصد میزان مطلوبیت طعم و مزه تیمارهای ماست کاهش معنی داری نشان داد ($p < 0.05$). ارزیابی نتایج حسی نشان داد که اختلافات معنی داری بین میزان شاخص عطر و بو تیمارهای ماست از نظر ارزیابی ها تا میزان استفاده ۳ درصد از پروتئین های هیدرولیز شده شاه بلوط وجود نداشت ($p < 0.05$). اما در مقادیر استفاده از پروتئین های هیدرولیز شده شاه بلوط به میزان ۴ و ۵ درصد میزان مطلوبیت عطر و بو تیمارهای ماست کاهش معنی داری نشان داد ($p < 0.05$). ارزیابی نتایج حسی نشان داد که اختلافات معنی داری بین میزان شاخص قوام تیمارهای ماست از نظر ارزیابی ها تا میزان استفاده ۳ درصد از پروتئین های هیدرولیز شده شاه بلوط وجود

نداشت ($p < 0.05$). اما در مقادیر استفاده از پروتئین های هیدرولیز شده شاه بلوط به میزان ۴ و ۵ درصد میزان مطلوبیت قوام تیمارهای ماست کاهش معنی داری نشان داد ($p < 0.05$). ارزیابی نتایج حسی نشان داد که اختلافات معنی داری بین میزان شاخص پذیرش کلی تیمارهای ماست از نظر ارزیاب ها تا میزان استفاده ۳ درصد از پروتئین های هیدرولیز شده شاه بلوط وجود نداشت ($p < 0.05$). اما در مقادیر استفاده از پروتئین های هیدرولیز شده شاه بلوط به میزان ۴ و ۵ درصد میزان مطلوبیت پذیرش کلی تیمارهای ماست کاهش معنی داری نشان داد ($p < 0.05$).



شکل ۷- مقایسه میانگین حسی تیمارهای ماست فراسودمند کم چرب با استفاده از پروتئین های هیدرولیز شده شاه بلوط در طی زمان نگهداری

بررسی نتایج حسی نشان داد که تیمارهای ماست با درصد پروتئین بالاتر ۴ و ۵ درصد به دلیل سفت تر شدن ماست اثرات نامطلوبی بر روی طعم و مزه داشته و چندان مورد توجه ارزیاب ها قرار نگرفت اما در مقادیر ۳ درصد به رغم دارا بودن محتوی پروتئینی بالا به دلیل دارا بودن استالیدی بیشتر و همچنین افزایش میزان بقای باکتری های استارتر از نظر عطر و بو نیز مورد توجه ارزیاب ها قرار گرفت و در این راستا نیز تحقیقات مشابهی نیز وجود داشت. فرقانی و همکاران (۱۳۹۶) خواص حسی و فیزیکیوشیمیایی ماست فراسودمند حاوی شیر پروتئین های یولاف را بررسی نمودند و دریافتند که مقادیر بالاتر پروتئین های شیر یولاف بالاتر از ۴ درصد می تواند مطلوبیت طعم و مزه را کاهش دهد که با یافته های تحقیق حاضر مطابقت داشت. Alvarez و همکاران (۲۰۰۵) از کنسانتره پروتئین شیر به عنوان منبع تأمین کننده ماده خشک بدون چربی شیر در فرمولاسیون بستنی وانیلی را بررسی نمودند و دریافتند که استفاده از کنسانتره پروتئین های شیر در مقادیر بالا مطلوبیت طعم و مزه و بافت را کاهش می دهد که با یافته های تحقیق حاضر مطابقت داشت. قوام تیمارهای ماست نیز به دلیل تاثیر پروتئین هیدرولیز شده شاه بلوط تا میزان ۳ درصد و افزایش میزان قابلیت نگهداری آب و کاهش درصد آب اندازی به طور معنی داری افزایش می یابد اما در مقادیر ۴ و ۵ درصد پروتئین هیدرولیز شده شاه بلوط میزان شاخص قوام افزایش می

یابد اما در مقادیر ۴ و ۵ درصد با کاهش میزان قابلیت نگهداری آب همان گونه که در بخش های قبلی گفته شده، میزان قوام نیز کاهش یافت که در این راستا نیز تحقیقات مشابهی وجود داشت.

Priyadarshani & Muthumuniarachchi در سال (۲۰۱۸) به بررسی فیزیکی شیمیایی و حسی ماست همزده ای که با ماش تقویت شده بود پرداختند. در این بررسی ماست همزده توسط شیر گاو استاندارد آماده شده بود و خمیر ماش به نسبت های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درصد (وزنی/وزنی) به آن اضافه شد. آن ها دریافتند که مقادیر بالاتر ماش می تواند مطلوبیت قوام و پذیرش کلی تیمارهای ماست همزده را کاهش دهد که با یافته های تحقیق حاضر مطابقت داشت. پذیرش کلی مجموعه ای از خصوصیات مختلف حسی می باشد که با توجه به مجموع امتیازات ارزیاب ها در کلیه خصوصیات حسی نشان می دهد که تیمار ماست دارای ۳ درصد پروتئین هیدرولیز شده دارای بالاترین میزان مطلوبیت حسی در بین تیمارهای ماست بوده و تیمارهای ۴ و ۵ درصد دارای مطلوبیت کمتری در مقایسه با سایر تیمارها و تیمار شاهد می باشد. تیمارهای دارای مقادیر ۱ و ۲ درصد دارای مطلوبیت بالاتر از تیمار شاهد و کمتر از تیمار ۳ درصد می باشد.

۴- نتیجه گیری کلی

به منظور تولید ماست فراسودمند در راستای اهداف کمک به سلامت مصرف کننده و فرمولاسیون محصولات جدید پروتئین شاخ بلوط هیدرولیز شده و در فرمولاسیون ماست استفاده شد. پس از آن ماست با فرمولاسیون بهینه از پروتئین هیدرولیز شده تهیه شده و مجموع امتیازات ارزیاب ها در کلیه خصوصیات حسی نشان می دهد که تیمار ماست دارای ۳ درصد پروتئین هیدرولیز شده دارای بالاترین میزان مطلوبیت حسی در بین تیمارهای ماست بوده و تیمارهای ۴ و ۵ درصد دارای مطلوبیت کمتری در مقایسه با سایر تیمارها و تیمار شاهد می باشند. تیمارهای دارای مقادیر ۱ و ۲ درصد دارای مطلوبیت بالاتر از تیمار شاهد و کمتر از تیمار ۳ درصد می باشد.

فهرست منابع

۱. اعتمادی، م.، صادقی ماهونک، ع.ر.، قربانی، م.، مقصدلو، ی. ۱۳۹۴. تولید و بررسی فعالیت شلاته کنندگی و قدرت احیاء کنندگی پروتئین های هیدرولیز شده حاصل از ایزوله پروتئین سویا، علوم غذایی و تغذیه، شماره ۴۹، ۶۵-۷۴.
۲. امیری رفتنی، ز.، صفری، ر.، بخشنده، ت.، احمدی واوسری، ت. ۱۳۹۵. تاثیر پروتئین های ماهی مرکب بر خصوصیات کیفی ماست قالبی کم چرب، فصلنامه علوم و صنایع غذایی، شماره ۵۶، دوره ۱۳، ۲۲-۱۱.
۳. پزشکی، س.، اجاق، س.م.، رضایی، م.، شعبانپور، ب. ۱۳۹۶. بهینه سازی پروتئین هیدرولیز شده با فعالیت آنتی اکسیدانی از امعاء واحشاء ماهی تن زردباله (*Thunnus albacares*) با آنزیم پروتامکس، مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، سال دوازدهم، شماره ۳، ۹۹-۱۰۸.
۴. پیری قشلاقی، ش.، صادقی ماهونک، ع.ر.، قربانی، م.، اعلمی، م. ۱۳۹۳. بهینه سازی فرآیند تولید پروتئین هیدرولیز شده از آب پنیر با استفاده از آنزیم آلکالاز، علوم و صنایع غذایی، شماره ۷۷، دوره ۱۵، ۱۴۴-۱۳۵.
۵. حسینی، ش.، غرقی، ا.، جمال زاده، ح.ر.، صفری، ح.ر.، حسینی، ش. ۱۳۹۲. مقایسه پروتئین هیدرولیز شده از امعاء و احشاء و سر ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix*) با استفاده از آنزیم آلکالاز و آنزیم های داخلی بافت، مجله علمی شیلات ایران، جلد ۲۱، شماره ۳، ۶۲-۵۵.
۶. داورنیا، ب.، معتمدزادگان، ع.، اسدی، غ.، عابدیان کناری، ع.، اویسی پور، م. ۱۳۹۱. تعیین طول زنجیره پپتیدی پروتئین هیدرولیز شده امعاء و احشاء ماهی تون زرد باله با آنزیم نیوتراز. پژوهش های علوم و صنایع غذایی ایران، دوره ۸، شماره ۲، ۱۴۹-۱۳۷. شریعت علوی، م.، صادقی ماهونک، ع.ر.، قربانی، م.، اعلمی، م.، محمدزاده، ج. ۱۳۹۷. تعیین شرایط بهینه تولید پروتئین

- هیدرولیز شده با قابلیت آنتی اکسیدانی و کاهندگی نیتریک اکسید از ضایعات گوجه فرنگی توسط آلکالاز، علوم و صنایع غذایی شماره ۸۴، دوره ۱۵، ۱۵۱-۱۳۷.
۷. شعبانی، پ و اکبری آدرگانی، ب. ۱۳۹۶. بهینه سازی تولید پروتئین هیدرولیز شده از پنبه دانه به روش سطح پاسخ علوم غذایی و تغذیه، سال پانزدهم، شماره ۴. ۶۰-۴۵.
۸. علی زاده، آ.، احسانی، م.، صفری، م.، ۱۳۸۸. تاثیر پروتئین های شیر تغلیظ شده به روش اولترافیلتراسیون بر خواص شیمیایی و حسی ماست. علوم و صنایع غذایی ایران، دوره ۶، شماره ۳، ۱۱۵-۱۰۹.
۹. غلامی، ن.، رفتنی امیری، ز.، صفری، ر. ۱۳۹۸، تاثیر پروتئین هیدرولیز شده سبوس برنج رقم طارم روی خواص فیزیکی شیمیایی ماست کم چرب، چهارمین کنگره بین المللی توسعه کشاورزی، منابع طبیعی، محیط زیست و گردشگری ایران، تبریز، <https://civilica.com/doc/972514>
۱۰. کاوه، ش.، صادقی ماهونک، ع.ر.، قربانی، م.، جعفری س.م. ۱۳۹۷. بهینه سازی تولید پپتیدهای آنتی اکسیدان توسط هیدرولیز آنزیمی پروتئین دانه شنبليله، علوم و صنایع غذایی، شماره ۸۴، دوره ۱۵، ۸۸-۷۵.
۱۱. متولی، ش.ا.، موسوی ندوشن، ر.، ربانی م. ۱۳۹۸. بررسی خواص عملکردی و تولید ماست فراسودمند با استفاده از کلاژنپوست ماهی سنگسر، علوم و صنایع غذایی، شماره ۹۳، دوره ۱۶، ۴۷-۳۵.
۱۲. مشکین فر، ن.، صادقی ماهونک، ع.ر.، ضیایی فر، ا.م.، قربانی، م.، کاشانی نژاد، م. ۱۳۹۳. بهینه سازی تولید پروتئین هیدرولیز شده از محصولات جانبی صنایع گوشت به کمک روش سطح پاسخ، نشریه پژوهش های صنایع غذایی، جلد ۲۴، شماره ۲، ۲۱۵-۲۲۵.
۱۳. مقصدلو، ع.، صادقی ماهونک، ع.ر.، قربانی، م.، توندرا، ف. ۱۳۹۷. بهینه سازی شرایط تولید پپتیدهای زیست فعال حاصل از هیدرولیز آنزیمی پروتئین گرده زنبور عسل توسط آنزیم گوارشی تریپسین و مقایسه آن با ژله رویال، نشریه علوم دامی، شماره ۱۸، ۱۶۰-۱۴۹.
۱۴. مهرگان نیکو، ع.ور.، صادقی ماهونک، ع.ر.، قربانی، م.، طاهری، ع.، اعلمی، م. ۱۳۹۲. بهینه سازی عوامل مؤثر در فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده ماهی کاراس به روش سطح پاسخ، نشریه فرآوری و نگهداری مواد غذایی، جلد ۵، شماره ۱، ۹۵-۱۱۰.
۱۵. نورمحمدی، ا.، صادقی ماهونک، ع.ر.، اعلمی، م.، قربانی، م.، صادقی، م. ۱۳۹۶. بهینه سازی هیدرولیز پروتئین کنجاله دانه کدوبا آلکالاز جهت دستیابی به بیشینه ویژگی ضد اکسایشی، نشریه فرآوری و نگهداری مواد غذایی، جلد ۹، شماره ۱، ص ۱۲-۱.
۱۶. هادی، م.، سلطانی، م.، محمدی، س. ۱۳۹۹. اثر استفاده از مقادیر مختلف ایزوله پروتئینی ایزوله آب پنیر و صمغ خرنوب بر ویژگی های کیفی ماست قالبی بدون چربی، علوم و صنایع غذایی، دوره ۱۱۰، شماره ۱۷، ۲۹-۱۵.
۱۷. همایونی تبریزی، م.، آسوده، ا.، شبستریان، ه. ۱۳۹۳. جداسازی و شناسایی پپتید جدید آنتی اکسیدانی از بتاکازئین شیرشتر با پپسین و پانکراتین، مجله دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دوره ۲۲، شماره ۱، ۵۶-۴۵.

18. Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y., & Nasri, M. 2009. Antioxidant and free scavenging radical activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*, 114(4):1198-1205.

19. Contreras, M.D.M., Hernández-Ledesma, B., Amigo, L, P J., Martín-Álvarez, Recio I. 2011. Production of antioxidant hydrolysate from a whey protein concentrates with thermolysin: Optimization by response surface methodology, *LWT - Food Science and Technology*,44:9-15.
20. Dabija1, A., Codină, G., Gâțlan, A.M., Sânduleac, E.T., Rusu, L. 2018. Effects of some vegetable proteins addition on yogurt quality, *Scientific Study & Research*, 19 (2):181 – 192
21. Diniz, A.M., Martin, A.M. 1997. Optimization of nitrogen recovery in the enzymatic hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) protein: Composition of the hydrolysates. *International Journal of Food Science and Nutrition*. 48: 191–200.
22. Fabio, M. D., Martin, A.M. 1997. Optimization of nitrogen recovery in the enzymatic hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) Protein.Completion of hydrolysate.*International Journal of Food Science and Nutrition*, 48: 191-200.
23. Fang, X., Xie N., Chen, X., Yu, H., Chen, J. 2012. Optimization of antioxidant hydrolysate production from flying squid muscle protein using response surface methodology. *Food and byproducts processing*; 676-682.
24. Guerard, F., Sumaya-Martinez, M.T., Laroque, D., Chabeaud, A.L. Dufosse, L.2007. Optimization of free radical scavenging activity by response surface methodology in the hydrolysis of shrimp processing discards, *Process Biochemistry* 42:1486–1491.
25. Hoyle, N.T., Merritt, J.H. Quality of fish protein hydrolysate from Herring (*Clupea harengus*). *J Food Science*. 1994; 59: 76–79.
26. Kristinsson, H.G., Rasco, B.A. 2000. Fish protein hydrolysates :Production, biochemical and functional properties. *Crc CrRev Food Science*. 40: 43–81.
27. Lia, Q., Shia, Ch., Wang, M., Zhoue, M., Liang, M., Zha., Yuana, E., Wange, Z.h., Yaof, M., Ren, J. 2019. Tryptophan residue enhances in vitro walnut protein-derived peptides exerting xanthine oxidase inhibition and antioxidant activities, *Journal of Functional Foods*, 53: 276–285.
28. Li, P., Wang, X., Yu, H., Xing, R., Xiaolin, Ch., Liu, S. 2017. Optimization of the Extraction and Stability of Antioxidative Peptides from Mackerel (*Pneumatophorus japonicas*) Protein, *BioMed Research International*, 1-14.
29. Ovissipour, M., Abedian, A., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Safari, R., Shahiri, H. 2009. The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persian sturgeon (*Accipenser persicus*) viscera. *Food Chemistry*, 115: 238-242.

30. Qing, Y. L., Chuanchao, sh., Min, W., Mao Zh., Ming, L., Ting, Zh., Erdong, Y., Wange, Zh., Maojin, Y., Jiaoyan, R. 2019. Tryptophan residue enhances in vitro walnut protein-derived peptides exerting xanthine oxidase inhibition and antioxidant activities, *LWT - Food Science and Technology*, 44: 9:15, 276-285.
31. Samadi, V.M., Ariaii, P., Hesari, J. 2021. The effect of grape seed protein hydrolysate on the properties of stirred yogurt and viability of *Lactobacillus casei* in it, *Food Science and Nutrition*, 9(4): 2180-2190.
32. Sato, A., Tanaka, K., Takada, N., Sawamura, Y. and Hirabayashi, T. 2010. Comparison of the phenolic content of easily removed Japanese chestnut 'Porotan' pellicle with other Japanese and Chinese chestnut cultivars. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 79(3):258-62.
33. Shahidi, F., Han, XQ., and Syniowiecki, J. 1995. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chemistry*. 53, 285-293.
34. Utomo, B.S.B., Suryaningrum, T.D and Haria, H.R. 2014. Optimization of enzymatic hydrolysis of fish protein hydrolysate (FPH) processing from the waste of catfish fillet production, *Squalene Bulletin of Marine & Fisheries Postharvest & Biotechnology*, 9 (3): 115-126.
35. Villanueva, A., Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J., Bautista, J., & Millán, F. 1999, Peptide characteristics of sunflower protein hydrolysates. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76(12): 1455-1460.

Feasibility and optimizing the production of low-fat functional yogurt using chestnut hydrated

Mohammadreza Aghajani fesharaki, Simin Asadollahi, Gholamhassan Asadi

¹ MSc Student, Department of Food Science and Technology, Islamic Azad University, Tehran Science and Research Unit

² Assistant Professor of Food Science and Technology, Islamic Azad University, Varamin-Pishva Unit

³ Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Islamic Azad University, Tehran Science and Research Unit

Corresponding author's email: siminasadollahi5@gmail.com

Abstract

Yogurt is one of the most important and consumed milk fermentation products which is prepared under special conditions of healthy milk by controlling the activity of certain lactic bacteria. Dairy products are an important part of per capita milk consumption, so it is necessary to investigate different methods to improve the quality of this product. In this study, the chestnut protein was used in 1, 2, 3, 4, and 5% amounts in the formulation of low-fat functional yogurt. The response surface methodology was used to optimize the hydrolyzed protein's antioxidant activity. Based on the factor levels, studies include enzymatic hydrolysis time (60-180 min), enzyme-to-substrate ratio (50-140 n/kg protein), temperature = 55 °C, and pH= 8. The response surface method (central composite design) was used to optimize enzymatic hydrolysis conditions. The tests evaluated for optimization include protein hydrolysis, antioxidant activity, and protein chain length. Yogurt treatment tests include evaluation of the viability of primer bacteria, dry matter percentage, sensory, water holding capacity, and viscosity. The results showed that with the use of chestnut hydrolyzed protein up to 3% showed that the percentage of watering holding capacity viscosity, water holding capacity, and dry matter index increased. In the end, the total score of evaluators in all sensory properties shows that yogurt treatment has 3% hydrolyzed protein with the highest sensory desirability among yogurt treatments, and 4 and 5% treatments have less desirability than other treatments and control treatments. Treatments with 1 and 2% values had higher desirability than control and less than 3% treatment.

Keywords: chestnut hydrolyzed protein, low-fat functional yogurt, optimization