Homepagr: https://sanad.iau.ir/journal/jfst E-ISSN: 2676-7155

(Original Research Paper)

Feasibility and Optimizing the Production of Low-fat Functional Yogurt Using Chestnut Hydrated

Mohammadreza Aghajani Fesharaki[1], Simin Asadollahi[2*], Gholam Hassan Asadi[3]

1- MSc Student of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2-Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.
3-Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Received:07/12/2022 Accepted:31/05/2023

DOI: 10.71810/jfst.2024.1004748

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. Basedon thefactor 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, thetotal 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.

*Corresponding Author::siminasadollahi5@gmail.com

E-ISSN: 2676-7155 سایت مجله: https://sanad.iau.ir/journal/jfst

(مقاله پژوهشی)

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

محمدرضا آقاجانی فشارکی[۱]، سیمین اسداللهی[۲*]، غلامحسن 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، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران.

۳-دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۹/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۳/۱۰

DOI: 10.71810/jfst.2024.1004748

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 بهینه‌سازی فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده از روش سطح پاسخ استفاده‌گردید. سطوح فاکتورها براساس مطالعات انجام شده شامل زمان هیدرولیز آنزیمی(۱۸۰- ۶۰ دقیقه)، نسبت آنزیم به سوبسترا (۱۴۰-۵۰آنسون/کیلوگرم پروتئین)، دما (۹۰-۳۰ درجه سانتی گراد)، pH در محدوده ۷ تا ۹ و آنزیم آلکالازبود. 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.

واژه های کلیدی: پروتئین هیدرولیز شده شاه بلوط، ماست فراسودمند کم چرب، بهینه سازی.

*مسئول مکاتبات:siminasadollahi5@gmail.com

۱-مقدمه

پروتئین‌ها به طور گسترده در صنعت غذا قابل استخراج و استفاده هستند. هیدرولیز آنزیمی یکی از روش‌های مورد استفاده جهت بهبود ویژگی‌های کاربردی و تغذیه‌ای پروتئین‌های غذایی است. اکسیداسیون چربی‌ها 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 آن ها پراکسیداسیون لیپیدها و ترکیبات مولکولی با وزن کم تولید شده در مراحل نهایی اکسیداسیون می‌باشد(۱). از این رو استفاده از آنتی اکسیدان های مصنوعی در سال‌های گذشته در صنایع غذایی رایج بوده اما باتوجه به نگرانیهای شایع مصرف کنندگان در رابطه باآنتی اکسیدانهای مصنوعی و به خطر افتادن سلامتی بدن، تحقیقاتی در رابطه با آنتی اکسیدان‌های 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 آن ها 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 اکسیدان‌های طبیعی جایگزین مناسبی برای آنتی اکسیدان‌های مصنوعی می باشد. پپتیدهای زیست فعال با جرم مولکولی کمتر از ۶۰۰۰ کیلو دالتون، در اندازه‌های ۲ تا ۲۰ اسیدآمینه می‌باشند. 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 آن ها به عنوان شلاته کننده ی فلزات واسطه، مهار رادیکال آزاد DPPH[1]، قدرت احیاء کنندگی یون آهن، فعالیت ضد سرطانی، کاهش فشار خون می‌باشد(۴). تاکنون بیشترین مطالعات پیرامون تاثیر فرآیند هیدرولیز آنزیمی بر ویژگی های هیدرولیزشده 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 منشاء 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 پروتئینها است. در سال های اخیرتوجه 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

1-2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

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 سرطان‌ها 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 محبوب‌ترین 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) تاثیر 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.

۲- مواد و روش ها

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, پرترن[1]ساخت آلمان) به آرد تبدیل شد. آرد حاصل به مدت ۱۶ساعت با حلال هگزان به نسبت ۳:۱ چربی‌گیری و در دمای اتاق خشک، و تا مرحله استخراج پروتئین در یخچال نگهداری شد(۵).

۲-۳- محتوی تانن تجمع یافته[2]

برای محاسبه تانن تجمع یافته نیز یک میلی لیتر محلول استخراجی فیبر شاه بلوط با ۲ میلی لیتر واکنشگر وانیلین[3](۰/۵ درصد وزنی/ حجمی) تهیه شد. محلول هیدروکسید کلر (۲ میلی لیتر، ۴ درصد وزنی/ وزنی) به مخلوط اضافه شد و سپس محلول در تاریکی انکوبه شد. پس از قرار گرفتن در تاریک 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 چربی‌گیری شده به نسبت ۱۰:۱ 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 دورg۵۰۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در سانتریفوژ یخچال دار (مدل[4] کامبی ۵۱۴ آر کره جنوبی) قرار گرفت. به منظور رسوب پروتئین‌های میوه شاه بلوط سوپرناتانت حاصل توسط اسیدکلریدریک ۱ نرمال به pH=5 رسانده شد و تحت شرایط مشابه سانتریفوژ شد. رسوب بدست آمده (کنسانتره پروتئین) برای هیدرولیز مورد استفاده قرارگرفت(۷).

۲-۵- هیدرولیز کنسانتره پروتئین میوه شاه بلوط

به منظور هیدرولیز کنسانتره پروتئین میوه شاه بلوط ، کنسانتره به نسبت (۵ درصد وزنی/ حجمی) در بافر فسفاتpH=۹ پراکنده شد. سپس آنزیم در شرایط مطابق با جدول مطابق کد بندی ۱ استفاده شد. در انکوباتور شیکردار (مدل

1-Perten

2-Condensed tannin content (CTC)
3-Vanillinreagen
4-Combi514R

VS-8480 ،کره جنوبی) با دور ۲۰۰ دور بر دقیقه انجام شد. در انتها واکنش آنزیمی در ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه متوقف شد و برای حذف ترکیبات اضافه سانتریفوژ کردن در ۵۰۰۰g به مدت ۳ دقیقه انجام گرفت(۸).

۲-۵-۱- محاسبه میزان ترکیبات فنولی کل[1]

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 واکنشگر فنولی فولین سیوکالتیو[2] (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 اسپکتروفتومنری اشعه فرابنفش – نور مرئی مدل (BIOMATE 3S, Thermo Scientific, MA). ساخت کشورآمریکا قرائت شد. غلظت های (۵۰۰-۱۰۰ میکروگرم برلیتر) به عنوان منحنی استاندارد استفاده شد(۹).

۲-۵-۲-محتوی تانن تجمع یافته[3]

برای محاسبه تانن تجمع یافته نیزیک میلی لیتر محلول استخراجی فیبر شاه بلوط با ۲ میلی لیتر واکنشگر وانیلین[4] (۰/۵ درصدوزنی/ حجمی) تهیه شد. محلول هیدروکسیدکلر (۲ میلی‌لیتر، ۴ درصد وزنی/ وزنی) به مخلوط اضافه شد و سپس محلول در تاریکی انکوبه شد. پس از قرارگرفتن در تاریک جذب در ۵۰۰ نانومتر بعد از ۲۰ دقیقه انکوباسیون اندازه گیری شد. برای اندازه گیری محتوی تانن تجمع یافته، استاندارد کاتچین درغلظت های (۳۰۰۰-۵۰۰ گرم/ میلی لیتر) استفاده شد(۱۱).

۲-۵-۳- ارزیابی درصد فیبرخام

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

۲-۶- آزمایشات بهینه‌سازی

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 تعین 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 منظور۱۰۰۰ میکرولیتر از نمونه پروتئین هیدرولیز شده با ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول (DPPH۰/۱ میلی مولار) تهیه شده در اتانول ۹۶ ٪مخلوط شد، مخلوط به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی نگهداشته شد. درنهایت 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).

رابطه(۱)

درصد فعالیت مهارکنندگی رادیکال های آزاد=(جذب نمونه کنترل-جذب نمونه کنترل/جذب شاهد)×۱۰۰

۲-۸- اندازه گیری درجه هیدرولیز

اندازه گیری درجه هیدرولیز مطابق با روش Merritt و Hoyle انجام شد. برای این منظور هیدرولیز نمونه توسط محلول تری کلرواستک ۲۰ درصد، حجم برابر از محلول فوقانی و تری کلرواستیک اسید ۲۰ درصد برداشته شد. محلول حاصل در دمای ۱۰ درجه سانتی گراد، با دورg ۶۷۰۰ و به

1-Total phenolic content (TPC)
2-Folin–Ciocalteu's phenol reagent
3-Condensed tannin content (CTC)
4-Vanillinreagen

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. نهایتا درجه هیدرولیز با استفاده از رابطه ذیل به دست آمد:

رابطه(۲)

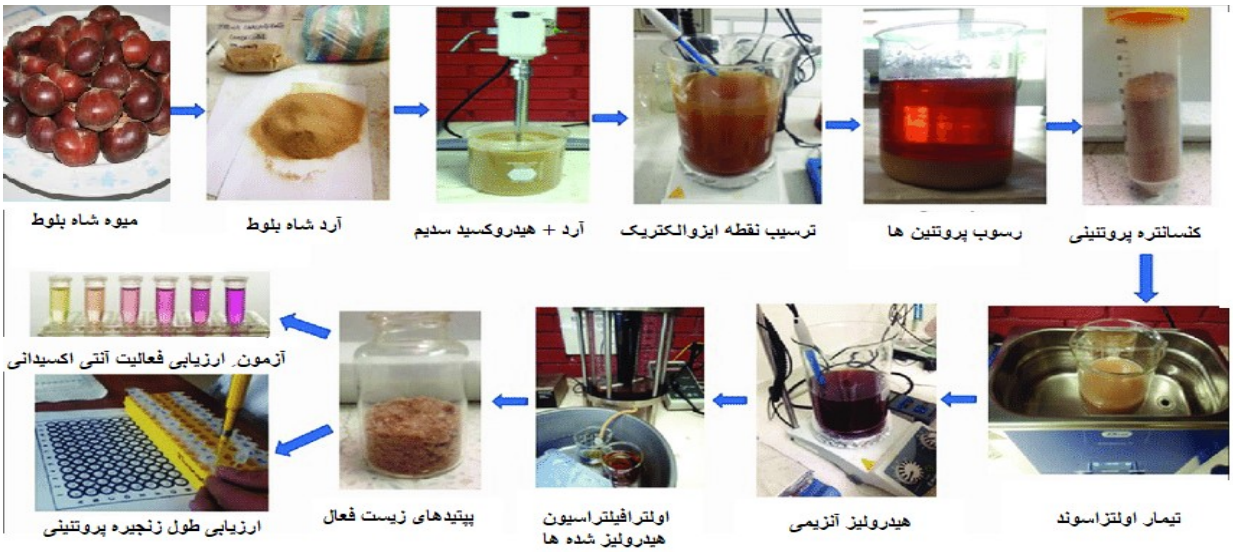
کل پروتئین های نمونه/ پروتئین حل شده در محلول ۱۰ درصد از تری کلرو استیک اسید=DH

۲-۹- اندازه‌گیری‌طول زنجیره‌پپتیدPCL[1]

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 درجه‌هیدرولیز (DH) برحسب درصد به‌کاربرده شده است.

رابطه(۳)

PCL=100/DH



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

1- Peptide Chain Length

جدول ۱- سطوح کد بندی و واقعی آزمایش ها در آزمایش بر اساس مطالعه روش رویه سطح پاسخ و طرح Central Composite

		Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4
Std	تیمار	درجه حرارت:A	زمان:B	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- تهیه و فرمولاسیون تیمارهای ماست

۲-۱۰-۱- فعالسازی استارتر

یک بسته استارتر ترموفیل (CH1 ساخت شرکت کریستین هانسن دانمارک) از نوع(DVS[1]حاوی *استرپتوکوکوسترمو-فیلوس* 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).

۲-۱۰-۲- قابلیت زنده مانی 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).

۲-۱۰-۳-تهیه و فرمولاسیون ماست

بعد از دریافت و استانداردکردن 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 ۵-۳ دقیقه حرارت دیده و تا دمای ۴۵-۴۰ درجه سلسیوس خنک شد. در این مرحله میکروارگانیسم آغازگر با نسبت ۱ درصد وزنی/ حجمی اضافه و بسته بندی شده و در انکوباتور (مدل RT3 شرکت ریحان 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 می‌شود (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.

1- Direct Vat Set

۲-۱۰-۴-ارزیابی درصد ماده خشک

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

۲-۱۰-۵- اندازه گیری درصد آب اندازی

مطابق روش Kadamany-Al 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).

رابطه(۳)

۱۰۰× وزن اولیه نمونه/وزن نمونه بعد از توزین- وزن اولیه نمونه=درصد آب اندازی

۲-۱۰-۶-اندازه گیری ویسکوزیته و بافت

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

۲-۱۰-۷- آنالیز بافت نمونه ها

آنالیز بافت آن ها نیز با ارائه مدل TPA[2]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).

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).

2-Texture Profile Analysis

رابطه(۴)

۱۰۰× [وزن اولیه نمونه ماست/(وزن تیوپ خالی- وزن تیوپ با لخته)]= ظرفیت نگهداری ماست

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.

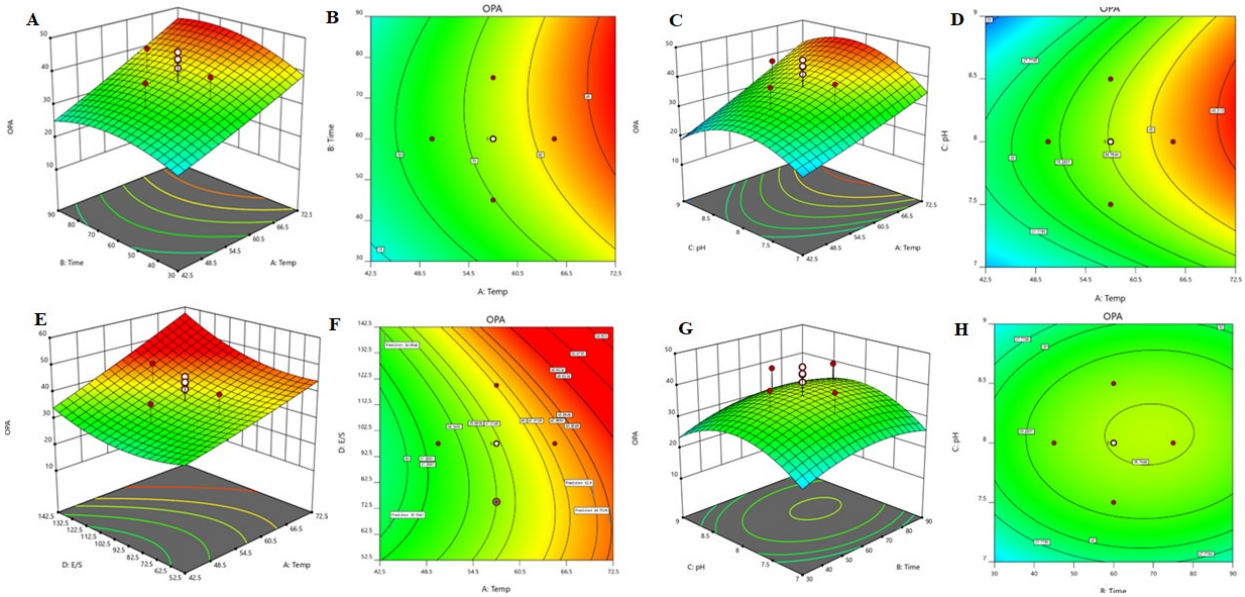
۳-۲-نتایج میزان گروههای آمین آزاد محصول‌هیدرولیز پروتئینی شاه بلوط

بر اساس جدول ۳ ملاحظه شد که رابطه OPA و متغیرهای تحقیق از نوع درجه دوم و با ضریب همبستگی R^2=۰/۹۵۸۸ 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>۰/۰۵) 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.

$$OPA=+۳۶/۹۲+۹/۱۱A+۲/۲۲B+۱/۰۱C+۴/۰۷D+۱/۵۹AB+۲/۴۳AC+۲/۶۳AC+۳/۶۲AD+۰/۵۰۵۷BC-۱/۱۰BD-۲/۸۲CD-$$
$$۰/۴۵۰۶BC-۲/۸۲CD+۰/۴۵۰۶A^2-۳/۷۶B^2-۸/۰۰C^2+۴/۴۸D^2$$

با توجه به شکل۲ (A, B) در شرایط ثابت (pH=۸ و E/S=۹۷/۵)، 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 میزان۱۰ در این محدوده حرارتی مشاهده شد. دما در محدوده ۳۰ تا ۹۰ دقیقه و در شرایط ثابت (pH=۸ و E/S=۹۷/۵)، تاثیرات معنی داری بر شاخصOPA 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 pH=۸ وE/S=۹۷/۵) و به میزان۳۰ مشاهده شد. نقطه بهینه مرکزی در شرایط ثابت pH=۸ وE/S=۹۷/۵)، 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 ۸ =pH 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 و۹۷/۵=E/S) (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 آمین‌آزاد محصول هیدرولیز پروتئینی‌شاه بلوط در شرایط ثابت (درجه حرارت= ۵۷/۵ درجه سانتی‌گراد و نسبت آنزیم به سوبسترا= ۹۷/۵)

جدول ۳- تجزیه واریانس شاخص OPA براساس مدل Quadratic

منبعتغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F-value	P-value
بلوک	۵	۲۸۵۱/۴۸	۵۷۰/۳۰	۱۴/۹۴	۰/۰۰۰۲
مدل	۱۴	۷۹۸/۸۲	۵۷/۰۶	۰/۷۵۳۵	۰/۴۰۷۹
A-درجه حرارت	۱	۲/۸۸	۲/۸۸	۱۴/۲۷	۰/۰۰۴۴
B– زمان هیدرولیز	۱	۵۴/۵۱	۵۴/۵۱	۲/۹۵	۰/۱۲۰۱
pH-C	۱	۱۱/۲۶	۱۱/۲۶	۴۸/۵۳	<۰/۰۰۰۰۱
D- نسبت آنزیم به سوبسترا	۱	۱۸۵/۳۲	۱۸۵/۳۲	۷/۱۱	۰/۰۲۵۸
AB	۱	۲۷/۱۵	۲۷/۱۵	۱۶/۶۴	۰/۰۰۲۸
AC	۱	۶۳/۵۴	۶۳/۵۴	۱۹/۴۸	۰/۰۰۱۷
AD	۱	۷۴/۳۸	۷۴/۳۸	۱/۰۸	۰/۳۲۶۰
BC	۱	۴/۱۲	۴/۱۲	۵/۰۹	۰/۰۵۰۵
BD	۱	۱۹/۴۳	۱۹/۴۳	۳۳/۳۵	۰/۰۰۰۳
CD	۱	۱۲۷/۳۷	۱۲۷/۳۷	۰/۰۰۰۸	ns۰/۵۲۹۷
A2	۱	۰/۰۰۳۲	۰/۰۰۳۲	۰/۳۰۷۷	
B2	۱	۱/۱۷	۱/۱۷	۱/۳۹	
C2	۱	۵/۳۲	۵/۳۲	۰/۳۰۷۵	
D2	۱	۱/۱۷	۱/۱۷	۱/۰۴	
باقیمانده	۹	۳۴/۳۷	۳۴/۳۷	۱/۰۴	
شاخص عدم تطبیق با داده های آزمایش	۶	۲۳/۲۳	۳/۸۷		
خطای کل	۳	۱۱/۱۴	۵/۷۷		
باقیمانده	۲۸	۳۶۸۴/۶۷			
ضریب همبستگی	۰/۹۵۸۸				
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 می یابد. افزایش بالاتر از ۵۷/۵ 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 افزایش‌درجه 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 آنزیمی‌پروتئین 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 یافته های 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 ادامه‌کاهش می‌یابد که با یافته های 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 شکل گیری ممانعت کننده ها کاسته می‌شود. نتایج تحقیق با یافته های مقصودلو و همکاران(۱۳۹۷) در بهینه سازی شرایط تولید پپتیدهای زیست فعال 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 می تواند به دلیل تولید ترکیبات بازدارنده ی آنزیمی در زمان هیدرولیز و درجات هیدرولیز بالا باشد که به عنوان سوبسترای رقابتی با پروتئین های هیدرولیز نشده عمل می کنند و باعث کاهش و یا توقف اثر آنزیم برروی سوبسترای اصلی می‌شوند (۵).

۳-۳- نتایج آزمون مهارکنندگی رادیکال های آزاد DPPH

مطابق با جدول ۳ ملاحظه شد که رابطه DPPH و متغیرهای تحقیق از نوع درجه دوم و با ضریب همبستگی R^2=۰/۹۷۱۶ می باشد. 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 داده های آزمایش معنی دار شد(p<۰/۰۰۳۸). تاثیر متغیر درجه حرارت، pH و نسبت آنزیم به سوبسترا بر میزان شاخص DPPH معنی دار می باشد و بنابراین مدل ذیل برای پیش بینی متغیرهای تحقیق پیشنهاد می شود.

$$DPPH=+۵۸/۳۳+۱۴/۷۰A+۲/۵۸B+۰/۰۴۸۳C+۴/۴۴D+۲/۰۹AB+۲/۰۰AC+۲/۳۸\ AD+۱/۰۵BC۱/۷۱-BD-۲/۷۵CD+۱۳/۲۱A^2-۱۳/۴۴B^2-۷/۲۲C^2-۰/۰۴۶۲D^2$$

با توجه به شکل ۲ مشاهده شد که در شرایط ثابت (pH=۸ و نسبت آنزیم/سوبسترا=۹۷/۵) با افزایش میزان درجه حرارت هیدرولیز، میزان مهارکنندگی رادیکال های آزاد به طور معنی داری افزایش یافت. به طوری در دمای ۴۲/۵ درجه میزان مهارکنندگی رادیکال های آزاد تا ۴۳/۶۸ و در دمای ۷۲/۵ درجه سانتی گراد میزان مهارکنندگی رادیکال های آزاد تا ۶۶/۷۸ درصد افزایش یافت. نقطه بهینه مرکزی مشاهده شده در شرایط ثابت (pH=۸ و نسبت آنزیم/ سوبسترا=۹۷/۵) در شرایط زمانی ۴۵ دقیقه هیدرولیز و درجه حرارت ۵۷/۵ درجه سانتی گراد به میزان ۶۲/۹۶ درصد مشاهده شد. افزایش زمان هیدرولیز از۳۰ دقیقه تا۶۰ دقیقه میزان درصد مهار کنندگی رادیکال های آزاد را به طور معنی داری افزایش داد. از محدوده ۶۰ دقیقه تا ۹۰ دقیقه کاهش معنی داری در میزان فعالیت آنتی اکسیدانی با روش DPPH مشاهده شد. نقطه بهینه مرکزی برای شاخص به میزان ۶۵ درصد در شرایط ثابت (pH=۸ و نسبت آنزیم/ سوبسترا=۹۷/۵) و درجه حرارت ۵۷/۵

درجه سانتی گراد و زمان۶۰ دقیقه مشاهده شد. سایر نقاط بهینه نیز در شرایط ثابت (pH=۸ و نسبت آنزیم/ سوبسترا=۹۷/۵) با میزان فعالیت آنتی اکسیدانی DPPH معادل ۶۲ (درجه حرارت ۵۷/۵ درجه سانتی گراد و زمان هیدرولیز ۴۵ دقیقه)، ۶۰/۱۴ (درجه حرارت ۵۷/۵ درجه سانتی گراد و زمان هیدرولیز ۷۵ دقیقه) و ۶۰/۰۷ (درجه حرارت ۵۰ درجه سانتی گراد و زمان هیدرولیز ۶۰ 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 می‌شود.

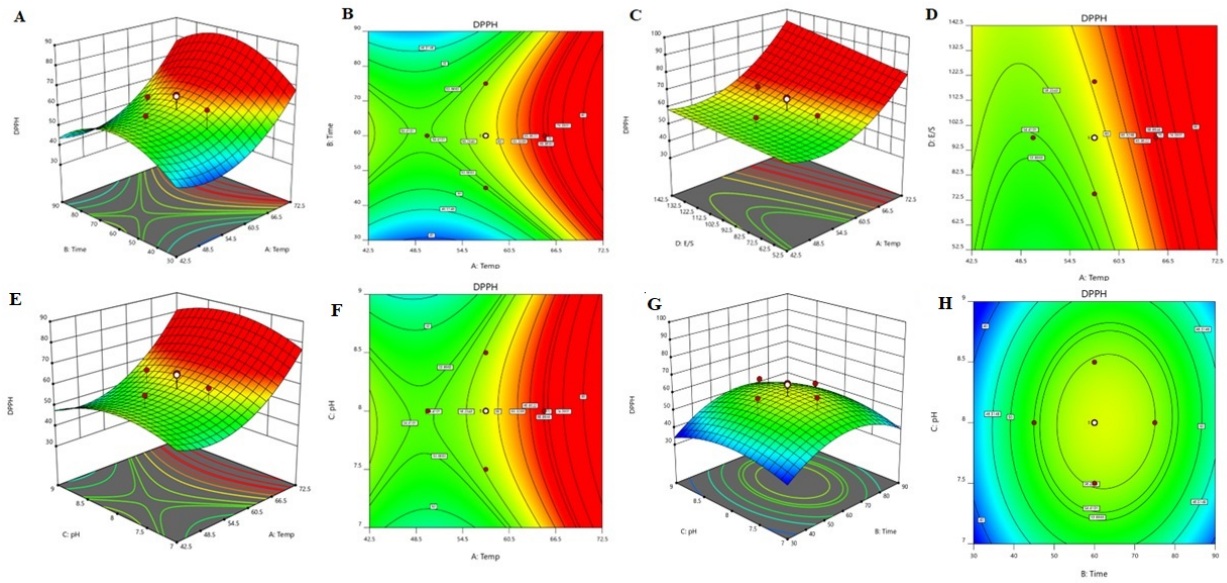
جدول ۴- تجزیه واریانس شاخص DPPH براساس مدل Quadratic

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

شواهد بیوشیمیایی، زیستی و بالینی فراوان وجود دارد که نشان می‌دهد واکنش اکسایشی ناشی از رادیکال‌های آزاد در ایجاد بیماری های مختلف، تسریع پیری و فساد موادغذایی دخالت دارد (۲۲) به دلیل خاصیت آنتی اکسیدان‌ها در ممانعت از اثرات رادیکال آزاد در ایجاد بیماری‌ها و فساد مواد غذایی، نقش و اثر آنتی اکسیدان‌ها مورد توجه محققین، پزشکان و عموم مردم قرار گرفته است و مطالعات ارزیابی ظرفیت آنتی اکسیدان یکی از متداولترین موضوعات مورد بررسی در سال‌های اخیر بوده است(۲۴). پیچیدگی آزمون‌ها و محدودیت‌های بررسی مستقیم سینتیک واکنش ممانعت-کنندگی آنتی‌اکسیدان‌ها از اکسیداسیون چربی‌ها که اغلب روش‌های دقیق‌تر و مطمئن‌تری می باشد موجب شد تا روش‌های ساده تر در ارزیابی ظرفیت آنتی اکسیدانی ابداع گردد(۲۵). بر این اساس روش‌های زیادی به شیوه های ظرفیت آنتی اکسیدانی و موثر، گوناگون در شرایط مختلف بودن آن ها 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 ویژگی های واکنش متفاوت مانند انواع مختلف آنتی اکسیدان‌ها، حضور سایر مواد مداخله کننده در نمونه، عدم شرکت همه آنتی اکسیدان‌های نمونه در واکنش روش مورد استفاده و ... که در واکنش اکسایشی دخالت دارند روش ساده و جهانی برای ارزیابی های صحیح و تعیین مقداری آنتی اکسیدان‌ها تاکنون به ثبت نرسیده است (۴). به علاوه تعیین ظرفیت آنتی اکسیدانی 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 آنتی اکسیدان (فاز آبی یا روغنی) که این خود باعث عدم نتیجه‌گیری از یک روش می گردد. بنابراین اغلب به منظور اعتبار بخشی به نتایج یک مطالعه از چندین روش برای تعیین ظرفیت آنتی اکسیدانی نمونه‌های خوراکی استفاده می‌شود(۸). به این ترتیب بزرگ ترین مشکل بر سر راه تعیین ظرفیت آنتی اکسیدانی 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 به دست نیامده است. اساس روشDPPH بر مبنای احیاء رادیکال آزاد) به وسیله آنتی اکسیدان‌ها در غیاب سایر رادیکال‌های آزاد در محیط می باشد 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 هیدروژن دهنده مانند یک ضد اکسایندە قرار گیرد، یک هیدروژن پذیرفته، به ترکیبی پایدار تبدیل شده و در نتیجه مهار رادیکال، تغییر رنگ محسوس از بنفش به زرد و ۵۱۷ نانومتر مشاهده می گردد (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 می روند. آنزیم آلکالاز منجر به هضم شدن باندهای پپتیدی از طریق شکستن پیوند میان آمینواسیدهای آب گریز 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 اگزو پپتیدازی جهت هیدرولیز، استفاده قرار گرفتند. هیدرولیز شده‌های حاصل در سیستمهای مدل به عنوان آنتی اکسیدان‌های 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 به‌کار رفته در تولید پروتئین هیدرولیزشده بود.

هیدرولیز شده‌ی حاصل از آنزیم فلیورزایم بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را در بین تمامی نمونه ها از خود نشان داد. نتایج تحقیق نشان داد که افزایش درجه حرارت هیدرولیز تا محدوده ۵۷/۵ درجه سانتی گراد میزان شاخص ظرفیت آنتی اکسیدانی اندازه گیری شده در هر دو روش ABTS و DPPH را افزایش می‌دهد. افزایش درجه‌حرارت هیدرولیز به دلیل افزایش نرخ هیدرولیز و ایجاد پروتئین های زیست فعال با خواص آنتی اکسیدانی می تواند منجر به افزایش میزان مهارکنندگی رادیکال های آزاد در هر دو روشDPPH 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 دریافتند که شرایط بهینه نشان می‌دهد که اثر متغیرهای واکنش بر پاسخ های آزمایش معنی دار است و افزایش درجه حرارت میزان درجه هیدرولیز را افزایش می دهد که با یافته های تحقیق حاضر مطابقت داشت. با توجه به این که آنزیم آلکالاز دارای دمای بهینه می باشد در نقاط بالاتر از نقاط مرکزی و کاهش میزان نرخ هیدرولیز، میزان شاخص فعالیت آنتی اکسیدانی به طور معنی داری کاهش یافت که با یافته های تحقیق حاضر مطابقت داشت. همچنین با افزایش نسبت آنزیم به سوبسترا و افزایش نسبت تولید آمین های آزاد و پپتیدهای زیست فعال میزان فعالیت آنتی اکسیدانی افزایش معنی داری را نشان داد اما در درجه هیدرولیز کمتر به جهت افزایش نسبت بیشتر از نقاط مرکزی میزان فعالیت آنتی اکسیدانی کاهش معنی داری را تجربه نمود.Karamac و همکاران (۲۰۰۲) در بررسی اثرات درجه حرارت و نسبت آنزیم بر سوبسترا بر میزان هیدرولیز پروتئین های ایزوله نخود با استفاده از تریپسین دریافتند 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 یافته های تحقیق حاضر مطابقت داشت. مدت زمان هیدرولیز نیز تاثیر معنی داری در شرایط ثابت بر میزان ترکیبات آنتی اکسیدانی DPPH و ABTS داشته و افزایش مدت زمان هیدرولیز به دلیل افزایش تاثیر آنریم بر سوبسترا و افزایش میزان دسترسی آنزیم در مدت زمان بیشتر، به طور معنی داری میزان فعالیت آنتی اکسیدانی را افزایش داد. مشکین فر و همکاران(۱۳۹۳) بهینه سازی 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 معده ی 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 سانتی گراد، دما ۵۲-۴۳ درجه سانتی گراد، زمان ۳۰ تا ۹۰ دقیقه بود. نتایج نشان داد که افزایش مدت زمان هیدرولیز از محدوده بهینه درجه هیدرولیز را کاهش می دهد که با یافته های تحقیق حاضر مطابقت داشت. با توجه به تاثیرات pH در میزان فعالیت آنزیم و درجه هیدرولیز آنزیمی نیز انتظار می رفت 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[1]از آنزیم آلکالاز با فعالیت آنزیمیAu/kg ۳۵ در دمای۵۵ درجه سانتیگراد،pH=5.8، و زمان‌های ۱۰ ،۲۰ و ۳۰ دقیقه هر یک در سه مرحله متوالی در غالب طرح آماری کاملاً تصادفی در سه تکرار استفاده کردند که با یافته های 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=۸ و نسبت آنزیم/سوبسترا=۹۷/۵)(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 ۶۰ دقیقه و نسبت آنزیم به سوبسترا معادل ۹۷/۵) (E&F) تاثیر متقابل اثرنسبت آنزیم به سوبسترا و درجه حرارت هیدرولیز بر میزان فعالیت آنتی اکسیدانی DPPH محصول هیدرولیز پروتئینی شاه بلوط در شرایط ثابت (زمان هیدرولیز ۶۰ دقیقه وpH معادل ۸)(G&H)

۳-۴- نتایج ارزیابی طول زنجیر پروتئینی

با توجه به جدول ۵ ملاحظه شد که رابطه طول زنجیره پروتئینی و متغیرهای تحقیق از نوع درجه دوم و با ضریب همبستگی R^2= ۰/۹۰۷۱ می باشد. بنابراین مدل به خوبی توانسته است ۹۰/۷۱ درصد از کل تغییرات را در محدوده متغیرهای مورد بررسی را توضیح دهد. شاخص عدم تطبیق با داده های آزمایش معنی دار شد (p<۰/۰۰۳۸). با توجه به جدول واریانس۴ تاثیرمتغیرهای pH و نسبت آنزیم به سوبسترا سوبسترا بر میزان شاخص طول زنجیره پروتئینی معنی دار می‌باشد و بنابراین مدل ذیل برای پیش بینی متغیرهای تحقیق پیشنهاد می شود.

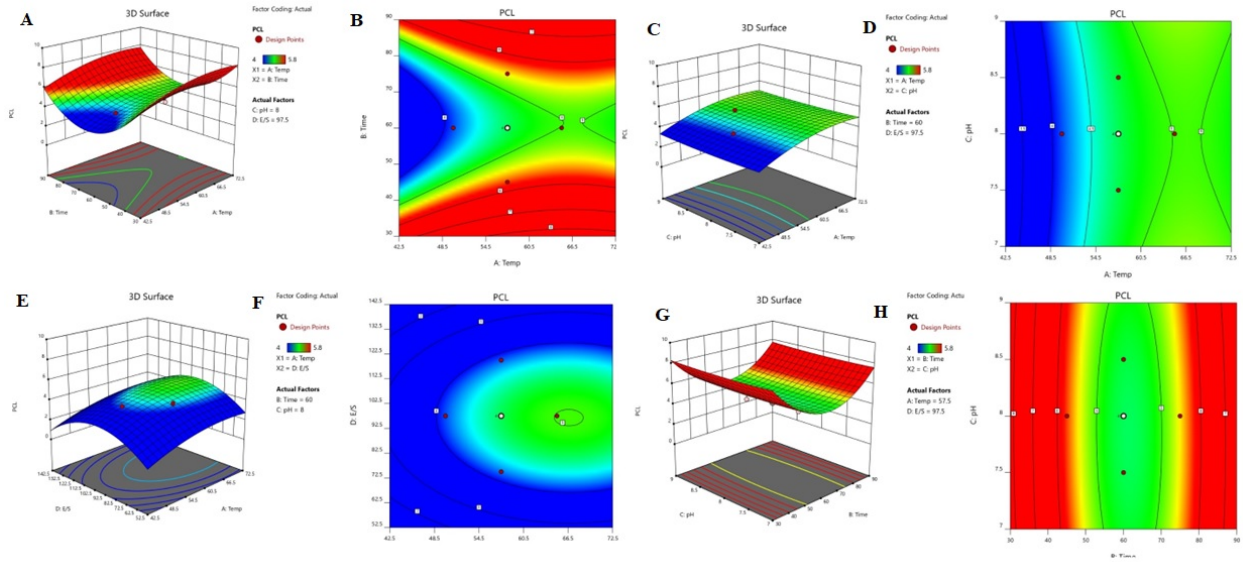
$$PCL=+۴/۷۵+۰/۸۶۶۱A-۰/۳۰۸۰B+۰/۰۳۴۵C+۰/۰۵۵۲D+۰/۲۵۷AB+۲/۰۰AC+۰/۳۸AD+۱/۰۵BC۱/۷۱-BD-$$
$$۲/۷۵CD+۱۳/۲۱A^2-۱۳/۴۴B^2-۷/۲۲C^2-۰/۰۴۶۲D^2$$

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. سایر نقاط بهینه نیز در شرایط ثابت (pH=۸ و نسبت آنزیم/ سوبسترا= ۹۷/۵) با میزان طول زنجیر پروتئینی معادل ۵ (درجه حرارت ۵۷/۵ درجه سانتی گراد و زمان هیدرولیز ۶۰ دقیقه)، ۶۰/۱۴ (درجه حرارت ۶۵ درجه سانتی گراد و زمان هیدرولیز ۷۵ دقیقه) و ۶۰/۰۷ (درجه حرارت ۵۰ درجه سانتی گراد و زمان هیدرولیز ۶۰ دقیقه) مشاهده شد. با توجه به شکل ۳ مشاهده شد که در شرایط ثابت (pH=۸ و نسبت آنزیم/سوبسترا= ۹۷/۵) با افزایش میزان زمان هیدرولیز، میزان طول زنجیر پروتئینی به طور معنی داری کاهش یافت. به طوری در دمای

۴۲/۵ درجه میزان مهارکنندگی رادیکال های آزاد تا ۴۳/۶۸ و در دمای ۷۲/۵ درجه سانتی گراد میزان طول زنجیر پروتئینی معادل ۴/۲ مشاهده شد. نقطه بهینه مرکزی مشاهده شده در شرایط ثابت (pH=۸ و 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 تا۶۰ 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 می‌یابد، اما با گذشت زمان غلظت زیاد این پپتیدها در مخلوط واکنش سرعت هیدرولیز را کاهش و طول زنجیره پپتیدی را افزایش می‌دهد(۲۱).

جدول ۵- تجزیه واریانس شاخص PCL براساس مدل Quadratic

منبع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F-value	P-value
بلوک	۵	۲/۷۵	۰/۵۵۰۵	۵/۵۸	۰/۰۰۹۹
مدل	۱۴	۴/۳۹	۰/۳۱۳۳	۰/۲۴۶۵	۰/۶۳۲۹
درجه حرارت	۱	۰/۰۱۳۸	۰/۰۱۳۸	۱۸/۲۸	۰/۰۰۲۷
B– زمان هیدرولیز	۱	۱/۰۳	۱/۰۳	۰/۲۲۸۹	۰/۶۴۵۲
pH-C	۱	۰/۰۱۲۹	۰/۰۱۲۹	۰/۵۴۲۴	۰/۴۸۲۵
D- نسبت آنزیم به سوبسترا	۱	۰/۰۳۰۵	۰/۰۳۰۵	۰/۲۷۹۱	۰/۶۱۱۶
AB	۱	۰/۰۱۵۷	۰/۰۱۵۷	۰/۲۵۷۷	۰/۶۲۵۴
AC	۱	۰/۰۱۴۵	۰/۰۱۴۵	۰/۱۲۶۵	۰/۷۳۱۳
AD	۱	۰/۰۰۷۱	۰/۰۰۷۱	۰/۲۷۸۱	۰/۶۱۲۳
BC	۱	۰/۰۱۵۶	۰/۰۱۵۶	۱/۸۸	۰/۲۰۷۶
BD	۱	۰/۱۰۵۶	۰/۱۰۵۶	۰/۰۱۱۱	۰/۹۱۸۶
CD	۱	۰/۰۰۰۶	۰/۰۰۰۶	۰/۰۸۴۸	۰/۷۷۸۳
A2	۱	۰/۰۰۴۸	۰/۰۰۴۸	۱۰/۷۱	۰/۰۱۱۳
B2	۱	۰/۶۰۱۶	۰/۶۰۱۶	۰/۰۱۷۵	۰/۸۹۷۹
C2	۱	۰/۰۰۱۰	۰/۰۰۱۰	۳/۱۰	۰/۱۱۶۳
D2	۱	۰/۱۷۴۲	۰/۱۷۴۲	۵۴/۴۵	۰/۰۰۷۲
باقیمانده	۶	۰/۴۴۹۵	۰/۰۵۶۲		
شاخص عدم تطبیق با داده های آزمایش	۹	۰/۴۴۲۰	۰/۰۸۸۴		
خطای کل	۳	۰/۰۰۷۵	۰/۰۰۲۵		
باقیمانده	۲۸	۷/۵۹			
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=۸ و نسبت آنزیم/سوبسترا=۹۷/۵)(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 سوبسترا معادل ۹۷/۵) (E&F) تاثیر متقابل اثرنسبت آنزیم به سوبسترا و درجه حرارت هیدرولیز بر میزان طول زنجیر پروتئینی محصول هیدرولیز پروتئینی شاه بلوط در شرایط ثابت (زمان هیدرولیز ۶۰ دقیقه وpH معادل ۸) (G&H) تاثیر متقابل اثرpH 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 سوبسترا معادل ۹۷/۵)

در مقادیر آنزیمی پایین با کاهش درجه هیدرولیز طول زنجیره پپتیدی بیشتر می‌شود که علت آن مربوط به ممانعت آنزیمی است که احتمالا 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 می‌شود 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 می‌باشد درجه هیدرولیز معمولا 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 می‌شود می‌تواند 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 تقریبا ۲۰۰ واحد تیروزین زیاد است که نشان می دهد بخش اصلی عملکرد آنزیم در سیستم پروتئینی در این فاصله زمانی اتفاق می‌افتد 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 پروتئیولیتیک می توان راندمان تولید نیتروژن محلول(پروتئین محلول) را افزایش داد. چنان چه غلظت سوبسترا از حد خاصی تجاوز کند(بالاتر 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. معمولا 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 می باشد. در یک پژوهش انجام شده در سال ۲۰۰۲ با هیدرولیز اسکلت ماهی کاد توسط پنج نوع آنزیم آلکالاز باکتریایی، نیوتراز، پروتامکس، تریپسین خوک و تریپسین کاد مشخص گردید که پروتئاز باکتریایی راندمان بیشتی در محلول سازی پروتئین ها داشته ولی تا حدی طعم تلخ غالب می‌گردد. هیدرولیزهای به دست آمده به دلیل کاهش وزن مولکولی معمولا 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 مهار رادیکال DPPH و درصد هیدرولیز پروتئینی OPA، در درجه حرارت ۵۷/۵ درجه سانتی گراد، زمان هیدرولیز۶۰ دقیقه، pH معادل۸، 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 ۵۷/۵۰ ، 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 می دهد 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 می تواند اثر متغیرهای درجه حرارت هیدرولیز، زمان هیدرولیز، نسبت آنزیم به سوبسترا وpH 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 ($p\leq ۰/۰۵$). به طور کلی در طی زمان نگهداری قابلیت زنده مانی باکتری های آغازگر ابتدا افزایش و سپس کاهش معنی داری نشان داد باکتری‌های *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه بولگاریکوس،میکروارگانیسم گرمادوستی هستندکه در زیرمیکروسکوپ معمولاً به اشکال میله‌ای کوتاه، و گاهی در فرم‌های بلندتر نیز دیده می‌شوند.این باکتری‌های گرممثبت، غیراسپورزا، بدون حرکت و کاتالاز منفی هستند که تحت شرایط شرح داده شده در استاندارد ملی ایران به شماره ۷۷۱۴ بر روی محیط کشتMRS آگار با pH اسیدی، کلنی‌های عدسی شکل به قطر ۱تا ۳ میلی‌متر اغلب با لبه های مشخص ایجاد می‌کنند. باکتری های *استرپتوکوکوس ترموفیلوس*، میکروارگانیسم‌های گرمادوستی هستند که در زیر میکروسکوپ به‌صورت یاخته‌های کروی و یا بیضی شکل به قطر۰/۷ تا ۰/۳ میکرون با آرایش دیپلوکوکسی یا زنجیرهای بلند می‌باشند. این باکتری‌ها گرم مثبت، بدون حرکت و کاتالاز منفی هستند و تحت شرایط شرح داده شده در استاندارد ملی ایران به‌شماره۷۷۱۴ بر روی محیط کشتM17

آگار، کلنی‌هایی به قطر ۲ میلی‌متر ایجاد می‌کنند. قابلیت زنده‌مانی باکتری‌های آغازگر ماست در روزهای صفر، هفتم و یازدهم تولید طی نگهداری در دمای۴ درجه سانتی‌گراد انجام پذیرفت. در مقادیر پروتئین تا میزان ۳ درصد شاه بلوط به دلیل این که این پروتئین می تواند منبعی برای تغذیه باکتری های آغازگر باشد، این می تواند به افزایش بقا و ماندگاری آن ها 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 مانی(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$_{ab}$	a۷/۱ ± ۰/۰۲$_a$	۶/۸ ± ۰/۰۱bc
ماست با ۲ درصد پروتئین شاه بلوط	b۶/۹۱ ± ۰/۰۱b	۶/۹۹ ± ۰/۰۳$_{ab}$	a۷/۶ ± ۰/۰۲a	۷/۰ ± ۰/۰۱a
ماست با ۳ درصد پروتئین شاه بلوط	b۶/۹۱ ± ۰/۰۱b	۶/۲ ± ۰/۰۱$_{ab}$	ab۷/۱ ± ۰/۰۲ab	۶/۸ ± ۰/۰۱$_{bc}$
ماست با ۴ درصد پروتئین شاه بلوط	b۶/۹۱ ± ۰/۰۱b	۶/۱ ± ۰/۰۱ab	bc۶/۸ ± ۰/۰۲bc	۶/۴ ± ۰/۰۱$_e$
ماست با ۵ درصد پروتئین شاه بلوط	b۶/۹۱ ± ۰/۰۱b	۵/۷۸ ± ۰/۰۱$_c$	۶/۵۵ ± ۰/۰۲c	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 مانی(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 ± ۰/۰۳a	۷/۶ ± ۰/۰۲$_a$	۷/۰ ± ۰/۰۱a
ماست با ۳ درصد پروتئین شاه بلوط	۶/۷۲ ± ۰/۰۱$_b$	۷/۲ ± ۰/۰۱ab	۷/۱ ± ۰/۰۲$_{ab}$	۶/۸ ± ۰/۰۱ bc
ماست با ۴ درصد پروتئین شاه بلوط	۶/۷۲ ± ۰/۰۱$_b$	۷/۰ ± ۰/۰۱ab	۶/۸ ± ۰/۰۲$_{bc}$	۶/۴ ± ۰/۰۱c
ماست با ۵ درصد پروتئین شاه بلوط	۶/۷۲ ± ۰/۰۱$_b$	۶/۷۸ ± ۰/۰۱c	۶/۵۵ ± ۰/۰۲c	۶/۲۳ ± ۰/۰۱d

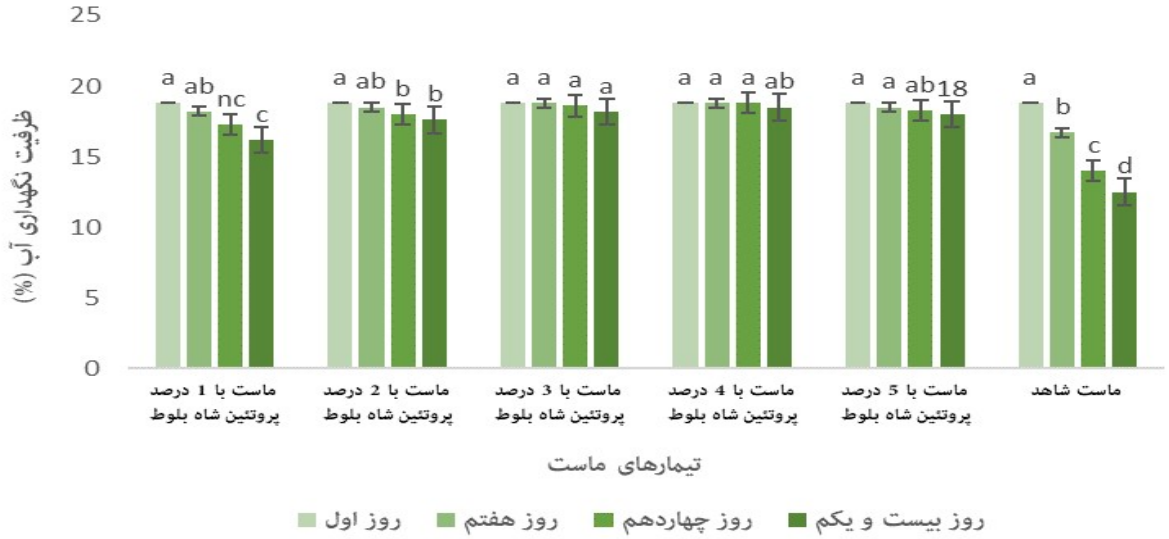
*داده ها میانگین± انحراف معیار می باشد.

*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 مانی باکتری های پروبیوتیک به نتایج مشابهی دست یافتند. آن ها دریافتند که مقادیر بالای پروتئین هیدولیز 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($p\leq ۰/۰۵$).



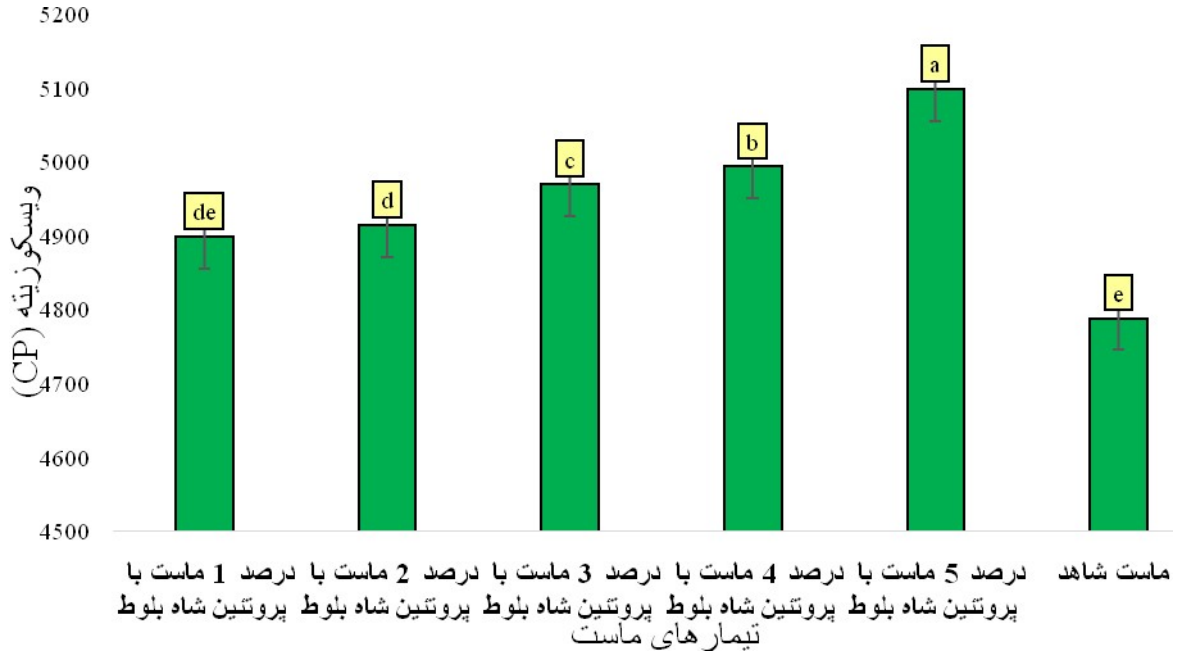
شکل ۴- مقایسه میانگین شاخص ماده خشک تیمارهای ماست فراسودمند کم چرب با استفاده از پروتئین های هیدرولیز شده شاه بلوط

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. طبیعتا 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[1] برخصوصیات کیفی ماست قالبی کم چرب 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 فیزیکو 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.

1-*Sepia Paraonis*

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($p\leq۰/۰۵$). 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 احتمالا به دلیل جذب آب ماست توسط پروتئین های 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.

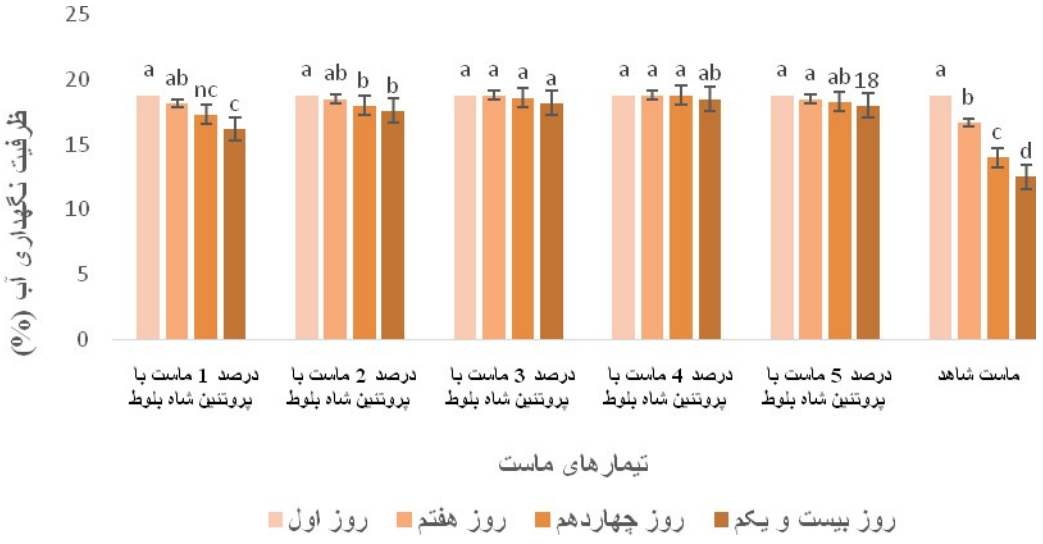


شکل ۵- مقایسه میانگین شاخص ویسکوزیته تیمارهای ماست فراسودمند کم چرب با استفاده از پروتئین های هیدرولیز شده شاه بلوط

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 یافت که با یافته های تحقیق حاضر مطابقت داشت.

۳-۹-نتایج ارزیابی ظرفیت نگهداری آب

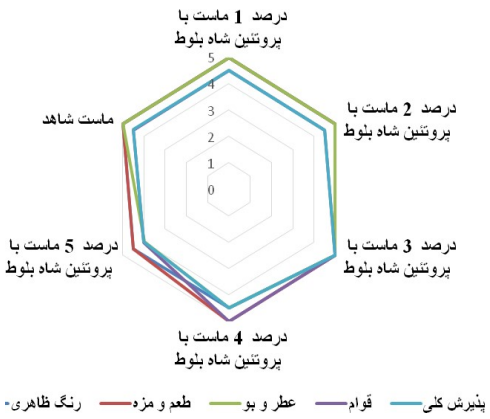
با توجه به شکل ۶ مشاهده شد که اختلاف معنی داری بین میزان میانگین شاخص ظرفیت نگهداری آب تیمارهای ماست در مقادیر ۱ تا ۳ درصد اختلافات معنی داری نشان نمی دهد($p>۰/۰۵$) اما در مقادیر ۴ و ۵ درصد اختلافات معنی داری با تیمار شاهد نشان دادند($p\leq۰/۰۵$). به کلی با افزایش میزان درصد پروتئین هیدرولیز شده شاه 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 ($p\leq۰/۰۵$). 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($p\leq۰/۰۵$). 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($p\leq۰/۰۵$). 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 پنیرو صمغ خرنوب برویژگی‌های 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.



شکل۶- 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 ارزیاب ها تا میزان استفاده ۳ درصد از پروتئین های هیدرولیز شده شاه بلوط وجود نداشت($p\leq۰/۰۵$). 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 ($p\leq۰/۰۵$). ارزیابی نتایج حسی نشان داد که اختلافات معنی داری بین میزان شاخص طعم و مزه تیمارهای ماست از نظر ارزیاب ها تا میزان استفاده ۳ درصد از پروتئین های هیدرولیز شده شاه بلوط وجود نداشت ($p\leq۰/۰۵$). 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 ($p\leq۰/۰۵$). ارزیابی نتایج حسی نشان داد که اختلافات معنی داری بین میزان شاخص عطر و بو تیمارهای ماست از نظر ارزیاب ها تا میزان استفاده ۳ درصد از پروتئین های هیدرولیز شده شاه بلوط وجود نداشت($p\leq۰/۰۵$). 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 ($p\leq۰/۰۵$).ارزیابی نتایج حسی نشان داد که اختلافات معنی داری بین میزان شاخص قوام تیمارهای ماست از نظر ارزیاب ها تا میزان استفاده ۳ درصد از پروتئین های هیدرولیز شده شاه بلوط وجود نداشت ($p\leq۰/۰۵$). 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 ($p\leq۰/۰۵$).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($p\leq۰/۰۵$). 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 ($p\leq۰/۰۵$).



شکل۷- 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 و۵ 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 استالدئید 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 فیزیکوشیمیایی 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 می‌یابد 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 فیزیکو-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 می‌باشد 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 می‌باشد.

۴- نتیجه گیری

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.

۵- منابع

۱. اعتمادی م، صادقی ماهونک ع. ر، قربانی م، مقصودلو ی. تولید و بررسی فعالیت شلاته‌کنندگی و قدرت احیاءکنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده حاصل از ایزوله پروتئین سویا. *علوم غذایی و تغذیه*. ۱۳۹۴؛ ۴۹: ۷۴-۶۵.

۲. امیری رفتنی ز، صفری ر، بخشنده ت، احمدی واوسری ت. تاثیر پروتئین های ماهی مرکب بر خصوصیات کیفی ماست قالبی کم چرب. *فصلنامه علوم و صنایع غذایی*. ۱۳۹۵؛ ۵۶(۱۳): ۲۲-۱۱.

۳. پزشک س، اجاق س.م، رضایی م، شعبانپور ب. بهینه سازی پروتئین‌هیدرولیزشده با فعالیت آنتی‌اکسیدانی از امعاء واحشاءماهی‌تن زردباله (*Thunnus albacares*) با آنزیم پروتامکس.

مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران. ۱۳۹۶؛ ۱۲(۳): ۱۰۸-۹۹.

۴. پیری قشلاقی ش، صادقی ماهونک ع. ر، قربانی م، اعلمی م. بهینه سازی فرآیند تولید پروتئین هیدرولیز شده از آب پنیر با استفاده از آنزیم آلکالاز. علوم و صنایع غذایی. ۱۳۹۳؛ ۷۷(۱۵): ۱۴۴-۱۳۵.

۵. حسینی ش، غرقی ا، جمال زاده ح. ر، صفری ح. ر، حسینی ش. مقایسه پروتئین هیدرولیز شده از امعاء و احشاء و سر ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix*) با استفاده از آنزیم آلکالاز و آنزیم‌های داخلی بافت. *مجله علمی شیلات ایران*. ۱۳۹۲؛۲۱(۳): ۶۲-۵۵.

۶. داورنیا ب، معتمدزادگان ع، اسدی غ، عابدیان کناری ع، اویسی پور م. تعیین طول زنجیره پپتیدی پروتئین هیدرولیز شده امعاء و احشاء ماهی تون زرد باله با آنزیم نیوتراز. *پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران*. ۱۳۹۱؛ ۸(۲): ۱۴۹-۱۳۷.

۷. شریعت علوی م، صادقی ماهونک ع. ر، قربانی م، اعلمی م، محمدزاده ج. تعیین شرایط بهینه تولید پروتئین هیدرولیزشده با قابلیت آنتی‌اکسیدانی و کاهندگی نیتریک اکسید از ضایعات گوجه‌فرنگی توسط آلکالاز. *علوم و صنایع غذایی*. ۱۳۹۷؛ ۱۴(۱۵): ۱۵۱-۱۳۷.

۸. شعبانی پ، اکبری آدرگانی ب. بهینه سازی تولید پروتئین هیدرولیز شده از پنبه دانه به روش سطح پاسخ. علوم غذایی و تغذیه. ۱۳۹۶؛ ۱۵(۴): ۶۰-۴۵.

۹. علی زاده آ، احسانی م، صفری م. تاثیر پروتئینهای شیر تغلیظ شده به روش اولترافیلتراسیون بر خواص شیمیایی و حسی ماست. *علوم و صنایع غذایی ایران*. ۱۳۸۸؛ ۶(۳): ۱۱۵-۱۰۹.

۱۰. غلامی، ن.، رفتنی امیری، ز.، صفری ر. ۱۳۹۸.، تاثیر پروتئین هیدرولیز شده سبوس برنج رقم طارم روی خواص فیزیکو شیمیایی ماست کم چرب، چهارمین کنگره بین المللی توسعه کشاورزی، منابع طبیعی، محیط زیست و گردشگری ایران، تبریز، https://civilica.com/doc/972514

۱۱. کاوه ش، صادقی ماهونک ع. ر، قربانی م، جعفری س. م. بهینه‌سازی تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان توسط‌هیدرولیز آنزیمی پروتئین دانه شنبلیله. *علوم و صنایع غذایی*. ۱۳۹۷؛ ۸۴(۱۵): ۸۸-۷۵.

۱۲. متولی ش. ا، موسوی ندوشن ر، ربانی م. بررسی خواص عملکردی و تولید ماست فراسودمند با استفاده از کلاژن پوست ماهی سنگسر. *علوم و صنایع غذایی*. ۱۳۹۸؛ ۹۳(۱۶): ۴۷-۳۵.

۱۳. مشگین فر ن، صادقی ماهونک ع. ر، ضیایی فر ا. م، قربانی م، کاشانی نژاد م. بهینه سازی تولید پروتئین هیدرولیز شده از محصولات جانبی صنایع گوشت به کمک روش سطح پاسخ. *نشریه پژوهش های صنایع غذایی*. ۱۳۹۳؛ ۲۴(۲): ۲۲۵-۲۱۵.

۱۴. مقصودلو ع، صادقی ماهونک ع. ر، قربانی م، توندرا ف. 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*. ۱۳۹۷؛ ۱۸: ۱۶۰-۱۴۹.

۱۵. مهرگان نیکو ع. و. ر، صادقی ماهونک ع. ر، قربانی م، طاهری ع، اعلمی م. بهینه سازی عوامل مؤثر در فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده ماهی کاراس به روش سطح پاسخ. *نشریه*

فرآوری و نگهداری مواد غذایی. ۱۳۹۲؛ ۵(۱): ۱۱۰-۹۵.

۱۶. نورمحمدی ا، صادقی ماهونک ع. ر، اعلمی م، قربانی م، صادقی م. بهینه‌سازی هیدرولیز پروتئین کنجاله دانه کدو با آلکالاز جهت دستیابی به بیشینه ویژگی ضد اکسایشی. *نشریه فرآوری ونگهداری مواد غذایی*. ۱۳۹۶؛ ۹(۱): ۱۲-۱.

۱۷. هادی م، سلطانی م، محمدی س. 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*. ۱۳۹۹؛ ۱۱۰(۱۷): ۲۹-۱۵.

۱۸. همایونی تبریزی م، آسوده ا، شبستریان ه. جداسازی سازی و شناساییک پپتید جدید آنتی اکسیدانی از بتاکازئین شیرشتر با پپسین و پانکراتین، *مجله دانشگاه علوم پزشکی سبزوار*. ۱۳۹۳؛ ۲۲(۱): ۵۶-۴۵.

19. Bougatef A, Hajji M, Balti R, Lassoued I, Triki-Ellouz Y, Nasri M. Antioxidant and free radical scavenging activities of smooth hound (Mustelus mustelus) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*. 2009; 114(4):1198-1205.
20. Contreras M. D. M, Hernández-Ledesma B, Amigo L P. J, Martín-Álvarez Recio I. Production of antioxidant hydrolysate from a whey protein concentrates with thermolysin: Optimization by response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology*. 2011; 44:9-15.
21. Dabija1 A, Codină G, Gâtlan A. M, Sănduleac E. T, Rusu L. Effects of some vegetable proteins addition on yogurt quality, *Scientific Study & Research*. 2018; 19 (2):181 – 192
22. Diniz A. M, Martin A. M. Optimization of nitrogen recovery in the enzymatic hydrolysis of dogfish (Squalus acanthias) protein: Composition of the hydrolysates. *International Journal of Food Science and Nutrition*. 1997; 48: 191–200.
23. Fabio M. D, Martin A. M. Optimization of nitrogen recovery in the enzymatic hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) Protein.Completion of hydrolysate. *International Journal of Food Science and Nutrition*. 1997; 48: 191-200.
24. Fang X, Xie N, Chen X, Yu H, Chen J. Optimization of antioxidant hydrolysate production from flying squid muscle protein using response surface methodology. *Food and byproducts processing*. 2012; 676-682.
25. Guerard F, Sumaya-Martinez M.T, Laroque D, Chabeaud A. L, Dufosse L. Optimization of free radical scavenging activity by response surface methodology in the hydrolysis of shrimp processing discards, *Process Biochemistry*. 2007*;* 42:1486–1491.
26. Hoyle N. T, Merritt J. H. Quality of fish protein hydrolysate from Herring (*Clupea harengus*). J *Food Science*. 1994; 59: 76-79.
27. Kristinsson H G, Rasco B. A. Fish protein hydrolysates :Production, biochemical and functional properties. Crc CrRev *Food Science*. 2000; 40: 43–81.
28. Lia Q, Shia Ch, Wang M, Zhoue M, Liang M Zha, Yuana E, Wange Z. h, Yaof M, Ren J. Tryptophan residue enhances in vitro walnut protein-derived peptides exerting xanthine oxidase inhibition and antioxidant activities. *Journal of Functional Foods.* 2019*;* 53: 276–285.
29. Li P, Wang X, Yu H, Xing R, Xiaolin Ch, Liu S. Optimization of the Extraction and Stability of Antioxidative Peptides from Mackerel (*Pneumatophorus japonicas*) Protein. *BioMed Research International*. 2017; 1-14.
30. Ovissipour M, Abedian A, Motamedzadegan A, Rasco B, Safari

R, Shahiri H. The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persian sturgeon (*Accipenser persicus*) viscera. *Food Chemistry*. 2009; 115: 238-242.

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